

# Templatgesteuerte Reaktionen von Peptidnukleinsäuren

Verknüpfungsreaktionen für die hochempfindliche und einzelbasenspezifische DNA-  
Detektion während der PCR sowie Zyklisierungsreaktionen zur Verminderung der  
Produktinhibierung

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Alexander Roloff

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz  
2. Prof. Dr. Christoph Arenz  
3. Prof. Dr. Ronald Micura (Leopold-Franzens-Universität Innsbruck)

Tag der Einreichung: 04.03.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014



## Kurzzusammenfassung

Reaktionen zwischen reaktiven Oligonukleotiden, die durch komplementäre Nukleinsäuretemplate in hoher effektiver Molarität angeordnet werden, haben auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik an Bedeutung gewonnen. Sie bieten die Möglichkeit zur Erzeugung von mehreren Signalmolekülen pro Templat, wenn die templatgebundenen Produkte durch neue Reaktanden verdrängt werden. Da die Produkte ebenfalls hohe Templat-affinitäten aufweisen, schränken sie jedoch die katalytische Templataktivität ein (Produkt-inhibierung).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein neuer Ansatz zur Umgehung der Produktinhibierung entwickelt. Dazu wurde eine DNA-vermittelte PNA-Verknüpfungsreaktion in eine PCR integriert. Die Reaktion wurde direkt durch das während der PCR vervielfältigte Templat ausgelöst und erfolgreich in der einzelbasenspezifischen Genotypisierung von genomischer DNA eingesetzt. Die Nachweisgrenze war mit 30 Templatmolekülen im Vergleich zu bisherigen templatgesteuerten Reaktionen um etliche Größenordnungen niedriger.

Ein alternativer Ansatz widmete sich neuen Strategien zur Verminderung der Produktinhibierung. Templatgesteuerte Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen lieferten zyklische Verknüpfungsprodukte, welche gegenüber ihren linearen Pendants durch deutlich geringere Templataffinitäten gekennzeichnet waren. Daher überstiegen die Ausbeuten jene von Verknüpfungsreaktionen ohne Zyklisierung. Die Zunahme der Templataffinität in Folge der Verknüpfung wurde jedoch durch die Zyklisierung nicht vollständig kompensiert. Daher wurden templatgesteuerte Transferreaktionen entwickelt, bei denen das DNA-Templat die Zyklisierung von nicht verknüpften Reaktionsprodukten steuert. Diese waren durch geringere Templataffinitäten als die linearen Reaktanden gekennzeichnet. Die Transfer-Zyklisierungsreaktionen lieferten bei fortgeschrittener Reaktion höhere Ausbeuten als Transferreaktionen ohne Zyklisierungsschritt. Dies bestätigte die erfolgreiche Verminderung der Produktinhibierung.

Schlagnote: DNA-Templat, native chemische Verknüpfung, Peptidnukleinsäuren, Produktinhibierung, Zyklisierung





## Abstract

Reactions between reactive oligonucleotides that are aligned by complementary nucleic acid templates at high effective molarities have gained considerable attention in the field of nucleic acid diagnostics. They are capable of generating multiple signaling molecules per target, if the template-bound products are replaced by fresh reactants. However, since product molecules usually exhibit high template affinities, they impede the catalytic activity of the template (product inhibition).

This work initially describes the development of a new approach that bypasses product inhibition. To this end, a DNA-mediated PNA-ligation reaction was integrated in a PCR. The reaction was directly triggered by the template which is amplified during PCR. Furthermore, the reaction was successfully applied in single base-specific genotyping of genomic DNA. The limit of detection (30 template molecules) was several magnitudes lower compared to previous template-controlled reactions.

In an alternative approach, new strategies to reduce product inhibition were developed. Template-mediated ligation-cyclization (“cycligation”) reactions generated cyclic ligation products that were characterized by significantly lower template affinities compared to their linear counterparts. The yields upon cyclization were higher than those from ligation reactions without cyclization. However, the increase in template affinity gained upon ligation of the reactants could not be completely compensated through product cyclization. Therefore, template-mediated transfer reactions were designed in which the DNA-template actuates the cyclization of non-ligated products. These were characterized by reduced template affinities compared to the linear reactants. The transfer-cyclization reactions produced higher yields than transfer reactions without a cyclization step, thereby confirming the successful reduction of product inhibition.

Keywords: cyclization, DNA template, native chemical ligation, peptide nucleic acids, product inhibition

Die experimentellen Arbeiten für diese Dissertation wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie im Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Januar 2009 bis Juni 2013 durchgeführt.

*„Probleme kann man nicht mit derselben  
Denkweise lösen, durch die sie entstanden sind“*

Albert Einstein  
(14.03.1879–18.04.1955)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand der Forschung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Nachweisverfahren für Nukleinsäuresequenzen .....	4
2.1.1 Artifizielle Nukleinsäureanaloga – Peptidnukleinsäuren (PNAs) .....	4
2.1.2 Enzymatische Nukleinsäureamplifikation – Polymerasekettenreaktion (PCR) .	6
2.1.3 Hybridisierungssonden .....	7
2.1.4 Enzymatisch prozessierbare Hybridisierungssonden .....	9
2.1.5 Nukleinsäuretemplatgesteuerte chemische Reaktionen.....	11
<b>3. Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>34</b>
4.1 Auswahl von relevanten Zielsequenzen .....	34
4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR.....	35
4.2.1 Synthese von modifizierten, orthogonal geschützten PNA-Monomeren .....	35
4.2.2 Synthese von PNA-Konjugaten für die fluorogene PNA-Verknüpfung .....	37
4.2.3 Optimierung des Fluorophorabstands im Verknüpfungsprodukt .....	40
4.2.4 Templatgesteuerte chemische PNA-Verknüpfung am H-Ras-Templat .....	43
4.2.5 Templatgesteuerte chemische PNA-Verknüpfung am B-Raf-Templat.....	46
4.2.6 Optimierung der Architektur des ternären Sonden-Templat-Komplexes.....	48
4.2.7 Einfluss der Thioesterreaktivität auf die Geschwindigkeit der PNA- Verknüpfung .....	49
4.2.8 Einzelbasenspezifität am Gap0-Templat und PNA-Verknüpfung am B-Raf-Templat im durchgehend gepaarten ternären Komplex .....	50
4.2.9 Einfluss der TMR-Anbindungsstelle auf den Signalanstieg und die Einzelbasenspezifität der templatgesteuerten PNA-Verknüpfung .....	52
4.2.10 Optimierung der Länge der einzelbasenspezifisch bindenden Aminothiol-PNA .....	54
4.2.11 Erhöhung der Einzelbasenspezifität durch kompetitive Hybridisierung sowie Vergleich zwischen benachbarter Hybridisierung und chemischer Verknüpfung .....	56
4.2.12 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Verknüpfungsprodukts und Bestimmung der Ausbeute der templatgesteuerten PNA-Verknüpfung....	58
4.2.13 Einfluss der Reaktivitäten der Thioesterkomponente und der 1,2-Amino- thioleinheit auf die Geschwindigkeit der PNA-Verknüpfung .....	61
4.2.14 Vergleich der Hydrolyseempfindlichkeit von PNA- $\beta$ Alanyl- und PNA- Glycylthioestern.....	64
4.2.15 Detektion des Wildtyptemplats .....	65

---

4.2.16	Kompatibilität der PCR mit dem Thioladditiv MESNa und den reaktiven PNA-Konjugaten .....	66
4.2.17	Detektion der templatgesteuerten Verknüpfungsreaktion während der PCR...	68
4.2.18	Vergleich der $\beta$ Ala-Cys-Ligation mit der Gly-Cys-Ligation während der PCR.....	71
4.2.19	Bestimmung der Nachweisgrenze und der Einzelbasenspezifität der PNA-Verknüpfung während der PCR .....	72
4.2.20	Diskussion .....	73
4.3	DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen .....	74
4.3.1	Synthese von bis-funktionalisierten PNA-Konjugaten für Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen .....	75
4.3.2	DNA-templatgesteuerte Verknüpfung am Ras-Templat .....	77
4.3.3	Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion mit Rezyklisierung des Templats .....	79
4.3.4	Templataffinitäten der linearen und zyklischen Reaktionsprodukte .....	80
4.3.5	Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen mit substöchiometrischen Templatkonzentrationen .....	82
4.3.6	Diskussion .....	86
4.4	DNA-templatgesteuerte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen .....	88
4.4.1	Synthese von bis-funktionalisierten PNA-Konjugaten für Transfer-Zyklisierungsreaktionen .....	89
4.4.2	DNA-templatgesteuerte Transfer-Zyklisierungsreaktionen mit substöchiometrischen Templatkonzentrationen .....	91
4.4.3	Vergleich der Transfer-Zyklisierungsreaktion mit der Transferreaktion ohne Zyklisierung .....	96
4.4.4	Templataffinitäten der linearen und zyklischen Reaktionsprodukte .....	99
4.4.5	Diskussion .....	101
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>104</b>
5.1	Zusammenfassung .....	104
5.2	Ausblick.....	112
<b>6.</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>114</b>
6.1	Reagenzien und Lösungsmittel.....	114
6.2	Geräte und Hilfsmittel .....	115
6.3	Allgemeine Syntheseprotokolle.....	120
6.4	Versuche zur PNA-Verknüpfung während der PCR.....	124
6.5	Versuche zu den PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen .....	145
6.6	Versuche zu den PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen .....	152
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>174</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>178</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

9.1 NMR-Spektren .....	178
9.2 Chromatogramme und Massenspektren von PNA-Konjugaten .....	182
<b>Danksagung.....</b>	<b>200</b>
<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>201</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>203</b>





# 1. Einleitung

Die molekulare Erkennung ist ein in der Natur weit verbreitetes Prinzip. Sie bildet in einer wichtigen Klasse der Biomoleküle – den Nukleinsäuren – die Grundlage für die selektive Interaktion mit Bindungspartnern. Hohe Bindungsaffinitäten werden dabei vornehmlich zu anderen Nukleinsäuren ausgebildet. Die dafür verantwortliche strukturelle Basis ist durch die Basenpaarkomplementarität gegeben. Hochspezifische Wechselwirkungen zwischen Adenin und Thymin sowie zwischen Guanin und Cytosin erlauben sowohl die Speicherung als auch die Vervielfältigung der genetischen Information in der doppelsträngigen Helixstruktur der 2'-Desoxyribonukleinsäure (DNA).<sup>[1-4]</sup>

Während der Replikation und der Transkription dienen die jeweiligen DNA-Einzelstränge als molekulare Schablonen für die Synthese ihrer Komplemente. Dieses einfach zu kontrollierende Prinzip wurde in der Wissenschaft zunächst genutzt, um mit Hilfe von Kondensationsreaktionen aktivierter (Oligo)nukleotide an Nukleinsäuretemplaten Rückschlüsse über die Entstehung des Lebens und die Mechanismen der präbiotischen, molekularen Evolution zu ziehen.<sup>[5-8]</sup> In weiterführenden Arbeiten fanden Verknüpfungsreaktionen von chemisch funktionalisierten Oligonukleotiden an DNA-Templaten zunehmende Beachtung als adäquate Mittel für den selektiven Nachweis von Nukleinsäuresequenzen.<sup>[9-11]</sup> Die benachbarte Hybridisierung der Reaktanden bewirkt dabei eine drastische Erhöhung der effektiven Molarität. So können hochverdünnte Oligonukleotidkonjugate eingesetzt werden, welche in Abwesenheit der Zielsequenz nur sehr langsam reagieren. Die molekulare Erkennung zwischen Reaktanden und Templat wird bei ausreichender Kürze der reaktiven Oligomere durch die Anwesenheit von Einzelbasenfehlpaarungen stark beeinträchtigt. Die dadurch erzielte Diskriminierung der Produktbildung an fehlpaarenden Templaten ist besonders in der Diagnostik von Einzelbasenmutationen, die an der Entstehung von Krankheiten wie beispielsweise Krebs beteiligt sind,<sup>[12]</sup> von Interesse.

Da die für eine Analyse zur Verfügung stehenden Nukleinsäuremengen meist gering sind, muss neben der hohen Spezifität solcher Reaktionen auch eine hohe Empfindlichkeit des Nachweises gewährleistet sein. Das am häufigsten verwendete Verfahren für die Vervielfältigung einer Nukleinsäuresequenz stellt die Polymerasekettenreaktion (PCR) dar.<sup>[13,14]</sup> Hier genügen mitunter einzelne Kopien des Templats für dessen enzymatische Amplifizierung. Die Implementierung einer templatgesteuerten Reaktion in die PCR könnte demnach zu einem hochempfindlichen und einzelbasenspezifischen DNA-Nachweisverfahren führen. Eine

andere Möglichkeit, die Sensitivität der Nukleinsäuredetektion durch templatkontrollierte Reaktionen zu erhöhen, liegt in der Reduzierung der Produktinhibierung; ein Phänomen, welches in der starken Bindung der Reaktionsprodukte an die Nukleinsäuretemplate begründet ist. Die Verminderung der Templataffinitäten von Produkten aus templatgesteuerten Reaktionen stellt dabei einen wichtigen Schritt zur Förderung der katalytischen Wirksamkeit der Template dar.

## 2. Stand der Forschung

In lebenden Systemen wird eine Vielzahl von wichtigen Funktionen von Proteinen ausgeübt. Die für ihren sequenziellen Aufbau benötigten Informationen sind in der DNA in Form von Nukleobasenabfolgen gespeichert. Dieser genetische Code gestattet es durch die Gesetzmäßigkeiten der Basenpaarkomplementarität einerseits die Informationen innerhalb der Zelle auf ein Trägermolekül, die Ribonukleinsäure (RNA), zu transkribieren, und anschließend an den Ribosomen in funktionale Proteine umzuwandeln. Andererseits ist so auch die Weitergabe der Informationen an die Tochterzellen durch die DNA-Replikation während der Mitose gewährleistet. Der genetische Code ist jedoch nicht unveränderlich. Selbst innerhalb einer Spezies unterscheidet sich das Genom verschiedener Individuen voneinander. Der Unterschied erscheint sehr klein; die Basenpaarabfolge von zwei Menschen variiert nur um ca. 0.1%.<sup>[12]</sup> Da das menschliche Genom jedoch aus ungefähr drei Milliarden Basenpaaren besteht, ergeben sich daraus ca. drei Millionen voneinander abweichende Nukleotide. Schätzungen zufolge befinden sich davon ungefähr die Hälfte in regulatorischen oder codierenden Bereichen der DNA und können somit das Expressionsmuster und die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine verändern.<sup>[15–17]</sup>

Die meisten solcher Abweichungen sind Einzelbasenpolymorphismen. Sie treten per Definition mit einer Frequenz von mindestens 1% innerhalb einer Population auf und werden von den Eltern über die Keimbahn an die Nachkommen vererbt. Die genetische Disposition eines Individuums, im Laufe seines Lebens Erbkrankheiten wie etwa die Sichelzellenanämie<sup>[18–20]</sup> oder die familiäre Hypercholesterinämie<sup>[21]</sup> zu entwickeln, wird durch die Art und Lage der Einzelbasenpolymorphismen bestimmt. Eine andere Form der Varianz stellen die sogenannten somatischen Punktmutationen dar. Sie werden im Laufe des Lebens durch Umwelteinflüsse wie beispielweise ultraviolettes Licht<sup>[22]</sup> oder die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien<sup>[23]</sup> sowie durch Fehler während der DNA-Replikation erworben und treten nur in einzelnen Zellen eines Organismus auf. Es sind oft diese somatischen Mutationen, welche dem Ausbruch von Krankheiten wie Krebs den entscheidenden Anstoß geben.<sup>[24]</sup> Daher besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von analytischen Methoden, mit denen Einzelbasenmutationen effizient detektiert werden können. Besondere Anforderungen werden dabei an die Empfindlichkeit solcher Verfahren gestellt, da Nukleinsäuren biologischen Ursprungs meist in sehr geringer Konzentration vorliegen.

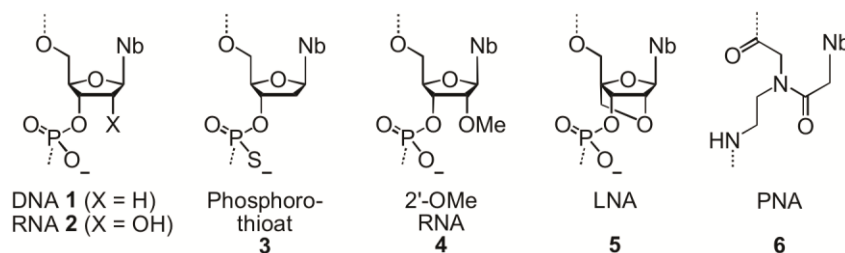
## 2.1 Nachweisverfahren für Nukleinsäuresequenzen

Der Nachweis einer bestimmten Nukleinsäuresequenz beruht in der Regel auf deren molekularer Erkennung durch komplementäre Oligonukleotidsonden. Die Hybridisierung ist dabei mit einem signalgebenden Schritt verbunden, welcher das Vorliegen des Analyten durch die Änderung einer messbaren Größe anzeigt. Neben natürlichen Nukleinsäuren kommen als Sonden mittlerweile häufig artifizielle Analoga zum Einsatz. Der folgende Abschnitt befasst sich mit einigen der meistgebrauchten synthetischen Derivate.

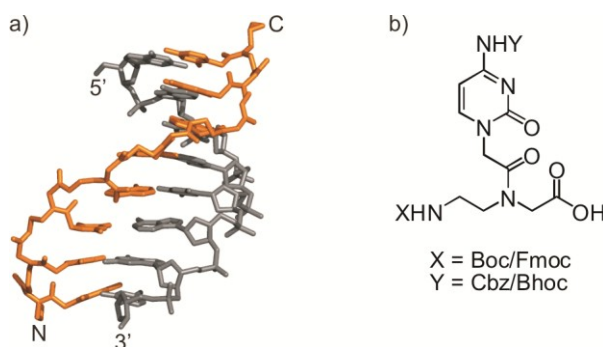
### 2.1.1 Artifizielle Nukleinsäureanaloga – Peptidnukleinsäuren (PNAs)

Aufgrund der Anfälligkeit von DNA (**1**) und insbesondere RNA (**2**) für den enzymatischen Abbau durch Nukleasen wurden artifizielle Nukleinsäurederivate entwickelt (Abbildung 1). Diese unterscheiden sich mitunter erheblich in der Architektur des Rückgrats, welches die Nukleobasen trägt. Dadurch wird eine Verminderung der Empfindlichkeit oder sogar eine vollständige Resistenz gegenüber einer enzymatischen Spaltung erreicht, was den Einsatz solcher Analoga in biologischen Milieus begünstigt.

Eine schon früh entwickelte Modifizierung des (2'-Desoxy)ribosephosphatrückgrats ist in den Phosphorothioaten (**3**) präsent.<sup>[25–27]</sup> Der Austausch eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom in den Phosphorsäurediestereinheiten bewirkt eine Erhöhung der Resistenz gegenüber verschiedensten Endo- und Exonukleasen. Eine andere Möglichkeit, den enzymatischen Abbau zu verlangsamen und gleichzeitig eine Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber der alkalischen Hydrolyse von RNA zu erreichen, bietet die Substitution des Wasserstoffatoms der 2'-OH Gruppe durch eine Methylgruppe in den 2'-OMe RNAs (**4**).<sup>[28–31]</sup> Ein anderer Ansatz wurde in den *locked nucleic acids* (LNAs, **5**) verwirklicht.<sup>[32–36]</sup> Die Verbrückung des 2'-Sauerstoffatoms mit dem 4'-Kohlenstoffatom über eine Methylen- einheit zwingt die Ribose in die 3'-endo-Konformation, was zu einer Verminderung der



**Abbildung 1:** Die natürlich vorkommenden Nukleinsäuren DNA und RNA sowie eine Auswahl artifizieller Nukleinsäureanaloga (Nb = Nukleobase).



**Abbildung 2:** a) Stabmodell eines antiparallelen PNA•DNA-8mer-Duplexes (Darstellung anhand einer NMR-Struktur,<sup>[37]</sup> PDB-Eintrag: 1PDT, modelliert mit *PyMOL*). b) Chemische Struktur eines PNA-Cytosinmonomers für die Festphasensynthese (es werden sowohl Boc/Cbz- als auch Fmoc/Bhoc-geschützte Monomere verwendet).

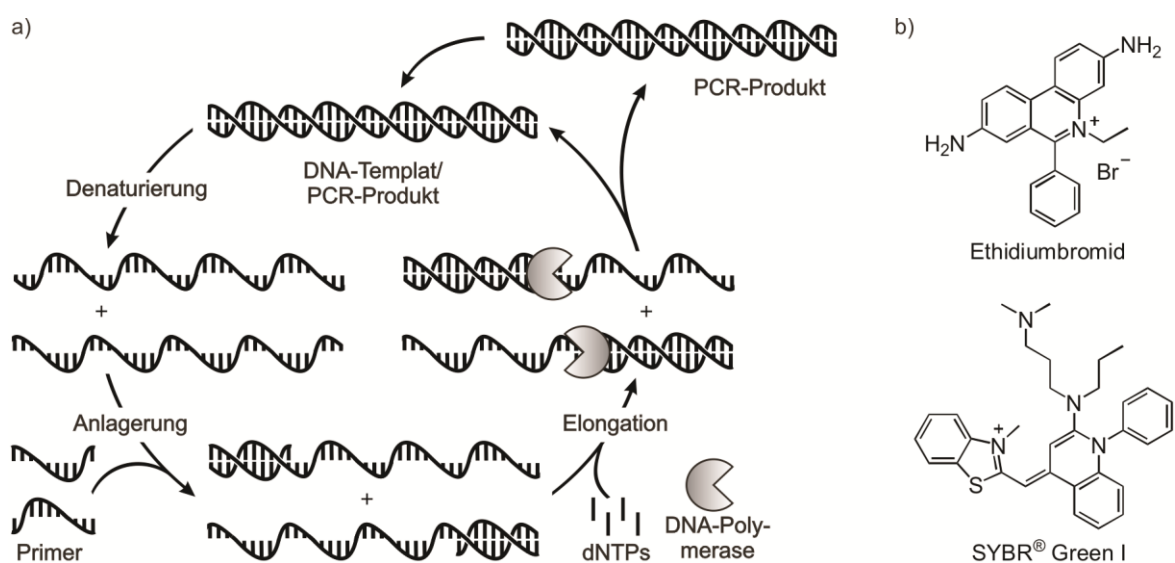
Flexibilität und zu einer Erhöhung der lokalen Präorganisation des Ribosephosphatrückgrats führt. Somit können deutlich höhere Affinitäten zu komplementären DNA- und RNA-Oligonukleotiden erzielt werden.<sup>[38,39]</sup> Ein Beispiel für eine synthetische Nukleinsäure mit einem azyklischen Rückgrat ist die Peptidnukleinsäure (PNA, **6**).<sup>[40–46]</sup> Das PNA-Rückgrat besteht aus einem Polyamid und besitzt Ähnlichkeit mit dem der Peptide. Die Rückgratstruktur verleiht der PNA ein für Nukleinsäurederivate außergewöhnlich hohes Maß an chemischer und biologischer Stabilität.<sup>[47–49]</sup> So wird sie weder von Säuren oder Basen noch von Nukleasen oder Proteasen in nennenswertem Umfang abgebaut. PNAs gemischter Sequenz bilden mit komplementärer DNA, RNA und PNA bevorzugt antiparallel angeordnete, rechtsgängige Doppelhelices aus (Abbildung 2a).<sup>[37,43,45,50]</sup> PNA•DNA-Duplexe sind im Vergleich zu ihren DNA•DNA-Pendants wesentlich stabiler, was auf die fehlende elektrostatische Abstoßung zwischen den Strängen zurückgeführt wird. Die beobachtete Unabhängigkeit der Bindungsaffinität von der Ionenstärke der Lösung unterstützt diese Argumentation. Zudem ist die Destabilisierung durch Einzelbasenfehlpaarungen in PNA-enthaltenden Komplexen höher.

Die chemische Synthese gelingt über die von Merrifield<sup>[51–53]</sup> entwickelte Peptidfestphasensynthese mit geschützten Monomerbausteinen (Abbildung 2b).<sup>[54]</sup> Neben der achiralen PNA wurden Derivate beschrieben, die an einem der drei Methylengruppen des Rückgrats Substituenten tragen. Dies gestattet die Einführung von Chiralität, welche das Hybridisierungsverhalten beeinflussen kann.<sup>[55–61]</sup> Vorteilhaft kann sich auch die Anwesenheit positiver Ladungen am PNA-Rückgrat auswirken. So passiert mit Guanidiniumgruppen funktionalisierte PNA (GPNA) die Zellmembran wesentlich leichter als herkömmliche PNA.<sup>[62]</sup> Außerdem ist sie besser wasserlöslich als das zur Aggregation neigende,

unsubstituierte Derivat. Schließlich bieten zusätzliche Seitenketten auch Möglichkeiten für die sequenzinterne Anbringung von anderen Funktionalitäten wie etwa Fluorophoren.<sup>[63–65]</sup>

### 2.1.2 Enzymatische Nukleinsäureamplifikation – Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Detektion von Nukleinsäuren biologischen Ursprungs ist nur möglich, wenn diese in ausreichenden Mengen vorhanden sind. Die genomische DNA beispielsweise liegt in den Zellen von Lebewesen mit einem diploiden Chromosomensatz in zwei Kopien vor. Demnach wäre die verlustfreie Extraktion des Genoms aus ca.  $3 \cdot 10^{10}$  Zellen notwendig, um in einem praktikablen Volumen (100  $\mu\text{L}$ ) eine für etablierte Detektionsverfahren ausreichend hohe Konzentration (1 nM) des Analyten zu erreichen. Da solche Mengen in der Regel nicht direkt zugänglich sind, bedient man sich meist eines in den 1980er Jahren von Mullis *et al.* entwickelten Verfahrens zur enzymatischen Amplifikation des zu untersuchenden Nukleinsäuresegments.<sup>[13,14]</sup> Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung von DNA durch die templatkontrollierte Verlängerung von sequenzspezifisch hybridisierenden Oligonukleotidprimern durch eine hitzeresistente DNA-Polymerase. Ein Zyklus aus Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) bei ca. 95 °C, raschem Abkühlen auf eine der Länge der Primer angepasste Anlagerungstemperatur und Temperieren auf 72 °C (dies ist die optimale Arbeitstemperatur der vorwiegend eingesetzten *Taq*-Polymerase) verdoppelt idealerweise die Nukleinsäurekonzentration mit jedem Durchlauf (Abbildung 3a). Dieser Grad der Amplifizierung ist jedoch nur am Anfang der PCR gegeben. In späteren Zyklen wird eine Plateauphase erreicht,



**Abbildung 3:** a) Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion (PCR). b) Strukturformeln zweier DNA-Interkalatorfarbstoffe für die *real-time* PCR (die Struktur von SYBR® Green I stammt aus Referenz [66]).

in der sich die Konzentration des PCR-Produkts nicht mehr nennenswert ändert. Mögliche Ursachen sind der zunehmende Verbrauch der Primer und der zu deren Verlängerung benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die vermehrte Deaktivierung der Polymerase durch wiederholtes Erhitzen sowie eine mit steigender Konzentration des Amplicons verstärkte Rehybridisierung des doppelsträngigen Produkts, die mit der Primeranlagerung konkurriert. Es wird auch diskutiert, dass die *Taq*-Polymerase unspezifisch an das PCR-Produkt bindet und dadurch in zunehmendem Maße inhibiert wird.<sup>[67]</sup> Dessen ungeachtet reicht in manchen Fällen schon ein einzelnes DNA-Molekül für eine erfolgreiche Amplifizierung aus.<sup>[68–70]</sup>

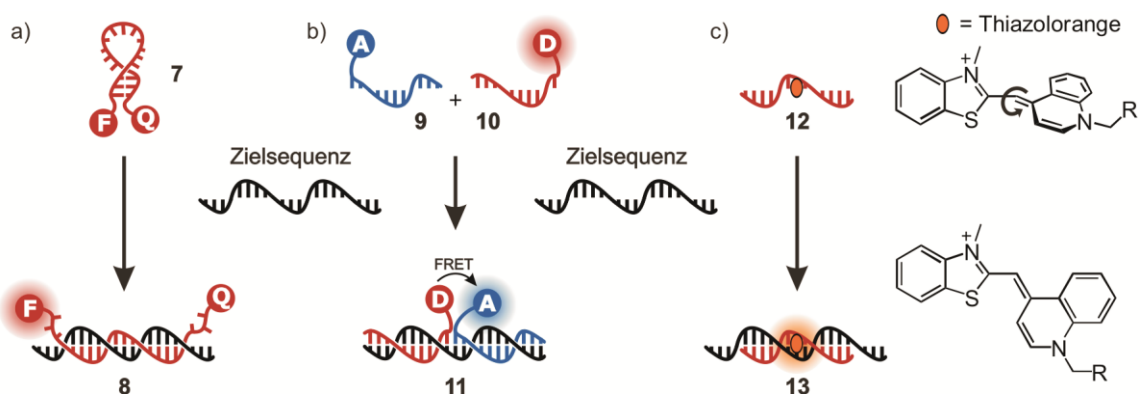
Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das entstandene PCR-Produkt zu detektieren. Eine der PCR nachgelagerte gelelektrophoretische Auftrennung der im Reaktionsgemisch enthaltenen Oligonukleotide ermöglicht die Bestimmung der Länge des PCR-Produkts durch den Vergleich mit bekannten Standards. Diese Methode ist jedoch zeitintensiv und gibt keinen Aufschluss über die Nukleotidsequenz des Amplicons. Um dessen Entstehung schon während der PCR mitverfolgen zu können, kann der Reaktionslösung ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt werden. Hierfür werden hauptsächlich Interkalatorfarbstoffe wie SYBR<sup>®</sup> Green I<sup>[71,72]</sup> oder SYBR<sup>®</sup> Gold<sup>[73]</sup> (in den ersten Berichten auch das karzinogene Ethidiumbromid)<sup>[74,75]</sup> verwendet (Abbildung 3b). Durch die Einlagerung dieser Verbindungen in den Basenstapel der entstehenden dsDNA kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der durch entsprechende Anregungs- und Emissionsfilter in Echtzeit ausgelesen werden kann (*real-time* PCR). Allerdings sind diese Farbstoffe nicht in der Lage, zwischen unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen zu differenzieren. Daher wurden eine Reihe von Hybridisierungs-sonden entwickelt, die eine spezifische Detektion einer bestimmten Region des Amplicons ermöglichen. Viele dieser Sonden werden auch für die nicht PCR-basierte Nukleinsäure-detektion eingesetzt. Im Folgenden werden einige Beispiele näher erläutert.

### 2.1.3 Hybridisierungs-sonden

*Molecular beacons* (MBs, 7, Abbildung 4a) sind dual markierte Oligonukleotidsonden, deren Erkennungssequenz in einer haarnadelförmigen Struktur von zwei kurzen, zueinander komplementären Nukleinsäuresegmenten flankiert wird.<sup>[76]</sup> Im geschlossenen Zustand der Stammregion befinden sich die terminal installierten Fluorophor- und Löschereinheiten in räumlicher Nähe zueinander, wodurch die Emission des Farbstoffs unterdrückt wird. Erst durch die Hybridisierung mit dem zur Erkennungssequenz komplementären DNA-Analyten

werden beide Gruppen voneinander separiert und es kommt zu einem Fluoreszenzanstieg (**8**). Durch den Einsatz unterschiedlich markierter MBs können mehrere Nukleinsäuresequenzen parallel detektiert werden.<sup>[77]</sup> Bei geeigneter Wahl von Temperatur bzw. Länge der Erkennungssequenz ist die Detektion von Einzelbasenmutationen in einer *real-time* PCR möglich.<sup>[78]</sup> Die Verwendung von nukleaseresistenten 2'-OMe-modifizierten MBs gestattet zudem die direkte Visualisierung von *messenger* RNAs (mRNAs) in lebenden Zellen.<sup>[79]</sup> Ein über die Detektion von Nukleinsäuren hinausgehender Ansatz wurde von Okamoto *et al.* beschrieben.<sup>[80]</sup> Statt eines Fluorophors verwendeten sie einen Phenacyl-ester, über welchen ein Biotinmolekül angebunden war. Durch die Trennung von Löscher und photospaltbarem Ester in Gegenwart der komplementären DNA konnte das Biotin mittels Bestrahlung freigesetzt werden. Damit ist eine Möglichkeit zur DNA-codierten Freisetzung von funktionalen Molekülen gegeben, was für eine genotypspezifische Therapie von Bedeutung sein kann.

Der Einsatz von zwei kurzen, benachbart hybridisierenden Sonden (*adjacent probes*)<sup>[81]</sup> kann die Einzelbasenspezifität gegenüber längeren Sonden erhöhen, ohne falsch positive Signale durch die Anwesenheit von multiplen Bindungsstellen zu forcieren. Beide Oligonukleotide (**9** + **10**, Abbildung 4b) sind terminal mit Fluorophoren markiert, deren Emissions- und Absorptionsspektren überlappen. Ein sich im angeregten Zustand befindender Donor-fluorophor kann bei räumlicher Nähe und geeigneter Orientierung zu einem längerwellig absorbierenden Akzeptorfluorophor über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung strahlungslos Energie auf diesen übertragen. Dieser nach dem Entdecker benannte Förster-Resonanz-energietransfer (FRET)<sup>[82,83]</sup> bewirkt eine Schwächung der Donoremission bei gleichzeitiger Induktion der Akzeptorfluoreszenz (**11**). *Adjacent probes* wurden erfolgreich in der *real-time*



**Abbildung 4:** Funktionsprinzip der a) *molecular beacons* (MBs), b) *adjacent probes* und c) FIT-Sonden (F = Fluorophor, Q = Fluoreszenzlöscher, A = FRET-Akzeptor, D = FRET-Donor).

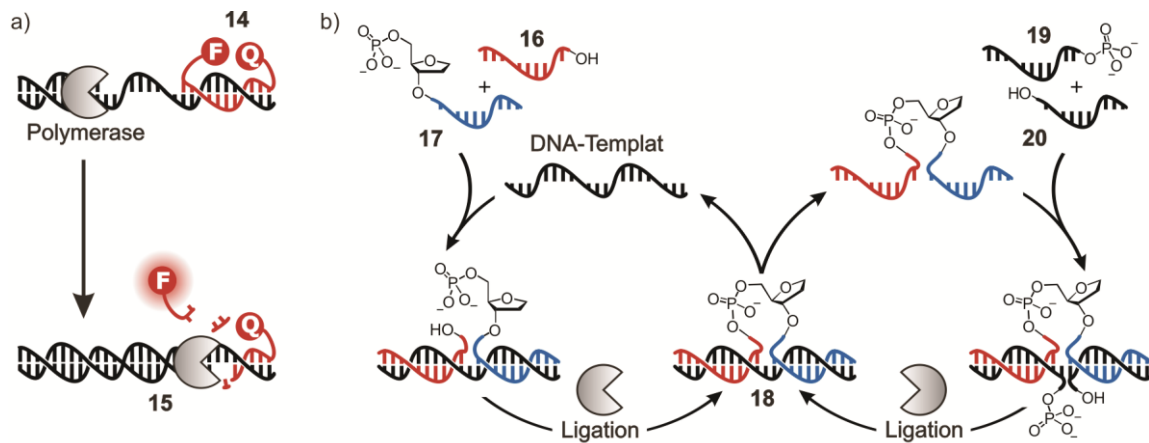


PCR eingesetzt.<sup>[71,72]</sup> Sie bieten den Vorteil, dass pro Sonde nur eine Farbstoffmarkierung benötigt wird, was den Synthesaufwand verringert. Die Detektion von Einzelbasenmutationen in PCR-Produkten konnte während der Amplifizierung oder über eine nachträgliche Schmelzkurvenanalyse erreicht werden.<sup>[84–87]</sup>

Die bisher vorgestellten Oligonukleotidsonden erzielen Einzelbasenspezifität ausschließlich über die Diskriminierung der Hybridisierung. Einen zusätzlichen Selektivitätsfaktor bringen Sonden mit umgebungssensitiven Fluorophoren mit sich. Zu dieser Klasse gehören die FIT-Sonden (**12**, FIT = *forced intercalation of thiazole orange*, Abbildung 4c), die ein sequenz-internes Thiazolorange als Basensurrogat tragen.<sup>[88–97]</sup> Nach optischer Anregung erlaubt die Rotation um die zentrale Methinbrücke einen strahlungslosen Übergang in den Grundzustand durch interne Konversion.<sup>[98]</sup> Diese Situation liegt im Einzelstrang als auch im Duplex neben einer Einzelbasenfehlpaarung vor, denn hier ist die Torsion ebenfalls erleichtert. Erst in der rigiden Umgebung zwischen zwei perfekt gepaarten Basen wird die Rotation eingeschränkt, sodass es zu einer Verstärkung der Fluoreszenz kommt (**13**). FIT-Sonden wurden zunächst als PNA und später auch als DNA entworfen. Sie finden in der *real-time* PCR Verwendung,<sup>[91,94,96]</sup> können aber auch für die RNA-Visualisierung in lebenden Zellen genutzt werden.<sup>[93–95,97]</sup>

#### 2.1.4 Enzymatisch prozessierbare Hybridisierungssonden

Ähnlich den in der PCR eingesetzten Primern werden auch Oligonukleotidsonden eingesetzt, die nach der Hybridisierung von Enzymen als Substrate erkannt werden. Ein solches System für die Echtzeitdetektion von PCR-Produkten bilden die *TaqMan*-Sonden. Sie basieren auf dem von Holland *et al.* eingeführten 5'-Nuklease-*assay*, welches die 5'→3'-Nukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase ausnutzt.<sup>[99]</sup> Eine am 5'-Ende fluorophormarkierte Hybridisierungssonde **14**, deren Emission durch einen intern oder 3'-terminal angebrachten Löscher unterdrückt ist, wird während des Elongationsschritts der PCR durch die Polymerase vom 5'-Ende her verdaut (Abbildung 5a). Dies führt zur Freisetzung des Fluorophors, dessen Emission aufgrund der räumlichen Trennung vom Löscher ansteigt (**15**). Das phosphorylierte 3'-Ende verhindert eine Verlängerung der Sonde durch die Polymerase.<sup>[100,101]</sup> Mit Hilfe von *TaqMan*-Sonden wurde erstmals eine quantitative PCR (qPCR) durchgeführt, mit deren Hilfe die Ausgangsmenge einer DNA-Zielsequenz (durch eine vorgeschaltete reverse Transkription (RT-PCR) ist auch RNA adressierbar) bestimmt werden kann.<sup>[102,103]</sup> In einem kompetitiven Format mit zwei allelspezifischen Sonden ist der *TaqMan assay* auch für die Detektion von homo- und



**Abbildung 5:** a) Funktionsprinzip der *TaqMan*-Sonden (F = Fluorophor, Q = Fluoreszenzlöcher). b) Basenlückeninduzierte DNA-Selbstreplikation durch enzymatische Ligation.

heterozygoten Einzelbasenmutationen geeignet.<sup>[104]</sup> Ebenfalls für die *real-time* PCR wurden *Scorpion Primers* entwickelt.<sup>[105]</sup> Sie sind ähnlich den MBs aufgebaut, fungieren aber zusätzlich als Primer für die Amplifizierung der DNA-Zielsequenz. Die Erkennungssequenz ist komplementär zu einer strangabwärts gelegenen Region des Amplicons und bindet diese nach erfolgter Primerverlängerung intramolekular. Dadurch wird die Geschwindigkeit des signalgebenden Schritts erhöht. *Scorpion Primers* erzielen somit besonders bei schneller Thermozyklisierung bessere Signalanstiege als MBs oder *TaqMan*-Sonden.<sup>[106]</sup>

Ein ligasevermittelter *assay* für den einzelbasenspezifischen Nachweis von Nukleinsäuren ist der *oligonucleotide ligation assay* (OLA).<sup>[107]</sup> Ähnlich den *adjacent probes* binden zwei DNA-Sonden in direkter Nachbarschaft an die Zielsequenz. Die sich gegenüberliegenden 3'-OH- und 5'-Phosphattermini werden durch die zugesetzte T4-Ligase verknüpft, wobei die Bildung des Ligationsprodukts als Indikator für die Anwesenheit der nachzuweisenden Sequenz dient. Die enzymatische Reaktion wird durch eine Fehlpaarung an der Verknüpfungsstelle gestört. Eine Steigerung der Selektivität konnte durch die Verwendung der *Tth*-Ligase erreicht werden.<sup>[108]</sup> OLAs wurden außerdem mit der PCR kombiniert, um die Nachweisgrenzen zu verringern. Dabei kann die Verknüpfungsreaktion nach der Amplifizierung erfolgen und mit Hilfe eines modifizierten *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) kolorimetrisch<sup>[109–111]</sup> oder nach einer Gelelektrophorese fluoreszenzspektroskopisch ausgelesen werden.<sup>[112]</sup> Es wurde auch eine Amplifizierungs-Ligationssequenz als homogene Eintopfreaktion beschrieben, in der die Detektion des Verknüpfungsprodukts aus zwei terminal fluorophormarkierten Sonden in Echtzeit über FRET erfolgt (*dye-labeled oligonucleotide ligation*, DOL).<sup>[113,114]</sup> Um die Degradierung der Sonden durch die DNA-

Polymerase zu verhindern, darf diese keine 5'-Nukleaseaktivität aufweisen. Außerdem muss das PCR-Protokoll in zwei Blöcke aufgeteilt werden, sodass die kurzen Sonden nicht von der Polymerase als Primer erkannt werden. Das Verfahren benötigt darüber hinaus eine thermostabile Ligase, welche die hohen Temperaturen während des Denaturierungsschritts der PCR übersteht.

Kürzlich wurde von Gibbs-Davis und Mitarbeitern ein auf dem OLA basierendes, isothermes Verfahren zur hochsensitiven DNA-Detektion beschrieben.<sup>[115]</sup> Eine templatkontrollierte Verknüpfungsreaktion durch die T4-Ligase führt zur Bildung eines Produktkomplexes **18** mit einer Basenlücke (Abbildung 5b). Die dadurch induzierte Destabilisierung des Duplexes ermöglicht die erneute Hybridisierung der Reaktanden **16** und **17** am Templat. Ein weiteres, zum Ligationsprodukt komplementäres Sondenpaar (**19** + **20**) kann nun ebenfalls an dieses binden und durch die Ligase verknüpft werden. Das Produkt der ersten Reaktion katalysiert demnach in einer zweiten Reaktion die Bildung des Templats und umgekehrt (Kreuzkatalyse). Durch den Einsatz von hohen Enzymkonzentrationen konnte eine bis zu zweimillionenfache Amplifizierung der Ausgangsmenge des Templats erreicht werden. Die Detektionsgrenze lag bei 140 fM.<sup>[116]</sup> Nachteilig ist die zwar verlangsamte, aber ebenso effektive Hintergrundreaktion in Abwesenheit des Templats, die auf der Erkennung des Komplexes aus allen vier Sonden durch die Ligase beruht. Außerdem wurde die Produktbildung über eine vergleichsweise zeitaufwendige Gelelektrophorese ausgelesen.

Während in den letzten Beispielen Oligonukleotidsonden enzymatisch prozessiert wurden, gestattet deren Ausstattung mit chemischen Funktionalitäten den Verzicht auf Enzyme. Mit dieser Art der templatgesteuerten Chemie befasst sich das nächste Kapitel.

### 2.1.5 Nukleinsäuretemplatgesteuerte chemische Reaktionen

Reaktionen von chemisch modifizierten Oligonukleotiden an Nukleinsäuretemplaten bieten gegenüber den zuvor genannten enzymatischen Umsetzungen einige Vorteile. Enzyme müssen zumeist aus Bakterienkulturen überexprimiert werden, was einen hohen Zeitaufwand und hohe Kosten verursacht. Viele Enzyme neigen zudem bei längerer Lagerung zur Denaturierung, wodurch zum Teil gravierende Unterschiede zwischen der eingesetzten Konzentration und der tatsächlichen Aktivität entstehen können. Chemische Verbindungen lassen sich dagegen oft einfach und schnell auf ihre Reinheit prüfen. Außerdem ist man nicht auf die von den Enzymen tolerierten Funktionalitäten beschränkt, sondern kann durch chemische Synthese eine Vielzahl von reaktiven Gruppen einbringen und artifizielle

Nukleinsäuren als Reaktanden nutzen. Dies erweitert das Spektrum der möglichen Reaktionen, erlaubt aber auch eine gezielte Anpassung der Reaktivitäten an die vor allem im biologischen Kontext nicht frei wählbaren Reaktionsbedingungen. Biokompatible Reaktionen, die keine zusätzlichen Reagenzien außer den Oligonukleotidsonden selbst benötigen, sind für eine Anwendung in Zellen prädestiniert, zumal die Möglichkeiten zur Einschleusung von Enzymen in lebende Systeme beschränkt sind.

Templatgesteuerte chemische Reaktionen werden in der Regel in hochverdünnten Lösungen durchgeführt. Erst die benachbarte Hybridisierung der Reaktanden am Nukleinsäuretemplat erhöht die effektive Molarität derart, dass die Reaktionen effizient ablaufen können. Dieses Prinzip ist mit der natürlichen Reaktivitätskontrolle in biologischen Systemen vergleichbar, wo hochverdünnte Reaktanden erst über die Anordnung durch Makromoleküle genügend hohe effektive Molaritäten für eine erfolgreiche Umsetzung erreichen.<sup>[117]</sup> Wie bei den zuvor vorgestellten *adjacent probes* erhöht der Einsatz von zwei kurzen Oligonukleotidsonden die Spezifität der Hybridisierung bezüglich Einzelbasensubstitutionen. Produkte werden also bevorzugt in Anwesenheit der perfekt komplementären Zielsequenz gebildet. Im Unterschied zu Hybridisierungssonden wird durch das entstandene Produkt jedoch ein permanentes Signal erzeugt, welches auch nach dessen Dehybridisierung vom Templat erhalten bleibt. Dies ermöglicht einen katalytischen Umsatz, bei dem die Verdrängung von templatgebundenen Reaktionsprodukten durch frische Reaktanden die Akkumulation von Produktmolekülen bewirken kann (*turnover*).<sup>[118,119]</sup> Die folgenden Abschnitte geben einen Einblick in die unterschiedlichen Reaktionstypen, welche in der nukleinsäuretemplatgesteuerten Chemie zum Einsatz kommen.

### **Nukleinsäuretemplatgesteuerte Verknüpfungsreaktionen**

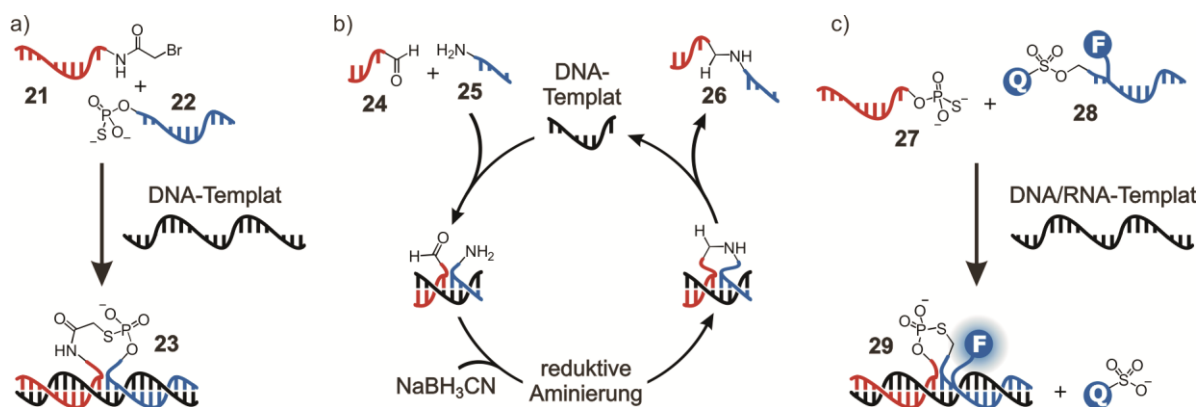
Verknüpfungsreaktionen gehören zu den am längsten genutzten Reaktionstypen. Die zugrunde liegenden chemischen Ligationsmethoden sind vielfältig und lassen sich relativ einfach in ein für die Oligonukleotidverknüpfung kompatibles Format integrieren. So wurde die carbodiimidvermittelte Verknüpfung zweier benachbart an einem Polyadenintemplat hybridisierenden Hexathymidinoligomere bereits 1966 von Naylor und Gilham beschrieben.<sup>[120]</sup> Die Veresterung der 3'-OH-Gruppe mit dem aktivierten 5'-Phosphat verlief allerdings sehr langsam und lieferte nur 5% Ausbeute des entsprechenden 12-mers nach vier Tagen Reaktionszeit. Über die templatgesteuerte Verknüpfung von Mono- und Dinukleotidphosphorimidazoliden zu Phosphordiestern und -amidaten, die mitunter durch hohe Sequenz-

spezifitäten gekennzeichnet waren, wurde später von Orgel *et al.* berichtet.<sup>[5,6,121–123]</sup> In weiterführenden Studien konnten auch artifizielle Nukleinsäuren wie beispielsweise PNA als Template und Substrate eingesetzt werden.<sup>[124–126]</sup> In neuesten Arbeiten von Richert und Mitarbeitern wurden reaktive Phosphorazabenzotriazole als elektrophile Nukleotide für die templatgesteuerte Verknüpfung mit aminomodifizierten Primern verwendet.<sup>[127–129]</sup> Selbst-replizierende Systeme, in denen das über carbodiimidvermittelte Veresterung erzeugte Verknüpfungsprodukt als Templat seine eigene Synthese katalysiert (Autokatalyse) oder in einer zweiten Reaktion die Bildung des Templates katalysiert (Kreuzkatalyse), wurden durch Orgel und von Kiedrowski untersucht.<sup>[7,8,130–134]</sup> Diese Arbeiten zielten darauf ab, einen möglichen Mechanismus für eine präbiotische, enzymfreie Replikation von Nukleinsäuren zu finden.<sup>[135]</sup>

Anders motiviert waren die Versuche von Shabarova *et al.*, welche Einblicke in die Effekte von intern positionierten Modifizierungen auf die Stabilität von DNA-Duplexen geben sollten. Im Zuge der carbodiimidvermittelten Synthese der Doppelstränge über die templatgesteuerte Verknüpfung aus den entsprechenden Oligonukleotidvorläufern fanden sie einen hemmenden Einfluss von fehlgepaarten Nukleotiden an der Verknüpfungsstelle auf die Reaktionsgeschwindigkeit.<sup>[136]</sup> Während diese Reaktionen mehrere Stunden bis Tage benötigten, wurde durch die Verwendung von Bromcyan als Kupplungsreagenz eine deutliche Erhöhung der Geschwindigkeit beobachtet. So konnten nach nur 1 min Reaktionszeit bis zu 96% Verknüpfungsprodukt erhalten werden.<sup>[137]</sup>

Gryaznov und Letsinger stellten 1993 eine Methode zur schnellen templatgesteuerten Verknüpfung von DNA-Oligomeren vor, die nicht auf den Zusatz von Aktivierungsreagenzien angewiesen ist (Autoligation, Abbildung 6a).<sup>[10]</sup> Die nukleophile Substitutionsreaktion zwischen einer 3'-bromacetylierten DNA-Sonde **21** und einem 5'-phosphorothioat-modifizierten DNA-Oligomer **22** lieferte das Ligationsprodukt **23** in 90% Ausbeute nach 20 min. Die gleiche Reaktion wurde auch hinsichtlich ihres Potentials für die Einzelbasen-mutationsdiagnostik untersucht.<sup>[11]</sup> Umsetzungen an einzelbasenfehlpaarenden Templaten lieferten bis zu 15-fach geringere Ausbeuten als jene an perfekt komplementären DNAs. Außerdem konnte dsDNA als Templat adressiert werden, wenn zur Triplexbildung über Hoogsteen-Basenpaarung befähigte Homopyrimidinsonden verwendet wurden.<sup>[138]</sup> Aufbauend auf Pionierarbeiten von Lewis und Hanawalt<sup>[139]</sup> zeigten unter anderem Letsinger,<sup>[140]</sup> Taylor,<sup>[141]</sup> Fujimoto<sup>[142–144]</sup> und Ihara,<sup>[145,146]</sup> dass sich auch Licht als „Aktivierungsreagenz“ für templatkontrollierte Photoligationen eignet. Dies hat den Vorteil, dass Startpunkt und Ende der Reaktion gut kontrolliert werden können. Für den Großteil der an den Nukleinsäure-

## 2. Stand der Forschung



**Abbildung 6:** Nukleinsäuretemplatgesteuerte a) Phosphorothioat→Bromid-Substitution, b) reduktive Aminierung mit Templatkatalyse und c) Phosphorothioat→Dabsyl-Substitution mit Fluoreszenzaktivierung (F = Fluorophor, Q = Fluoreszenzlöcher).

sonden installierten photoreaktiven Gruppen wie beispielsweise 4-Thiothymidin<sup>[141]</sup> oder Anthracen<sup>[145,146]</sup> eignet sich eine Anregungswellenlänge von 366 nm. Dadurch werden die durch niederwelliges ultraviolettes Licht induzierten Nebenreaktionen der Nukleobasen wie beispielsweise die Bildung von Pyrimidindimeren vermieden. Die meisten der beschriebenen Methoden ermöglichten zudem die Detektion von Einzelbasenmutationen.

Im Hinblick auf den *turnover* sind Ligationsreaktionen aufgrund der besonders stark ausgeprägten Produktinhibierung gegenüber Umsetzungen, die nicht zu einer Verknüpfung der Reaktanden führen, benachteiligt. Die Länge der Verknüpfungsprodukte bedingt eine starke Zunahme der Templataffinität und erschwert die Verdrängung durch die kurzen Reaktanden. Eine Strategie zur Verringerung der Produktinhibierung von Ligationsreaktionen unter isothermen Bedingungen wurde von Lynn und Mitarbeitern entwickelt.<sup>[147]</sup> Das Verfahren beruht auf einer templatkontrollierten reduktiven Aminierung von aldehyd- und aminterminierten Trimeren (**24** + **25**) mittels Natriumcyanoborhydrid (Abbildung 6b).<sup>[9,148]</sup> Das entstandene sekundäre Amin im Rückgrat des Produkts **26** erhöht die Flexibilität an der Verknüpfungsstelle, wodurch **26** eine signifikante Abnahme der Templataffinität erfährt.<sup>[149]</sup> Die Reaktion lieferte über 50 Produktmoleküle pro Templat, wenn dieses bezüglich der Reaktanden in substöchiometrischen Mengen (0.01 Äquiv.) vorlag.<sup>[148]</sup>

Albagli *et al.* entwarfen ein auf Kreuzkatalyse basierendes System zur templatkatalysierten Detektion von DNA-Sequenzen.<sup>[150]</sup> Die Verknüpfung erfolgte über eine (2+2)-Photocycloaddition zwischen einer cumarinmodifizierten DNA-Sonde und einem Thymin in der zweiten Sonde. Um eine Reaktion mit dem ebenfalls thyminhaltigen Templat zu vermeiden, trugen beide Reaktanden an ihren zugewandten Termini einen komplementären

Überhang, dessen kurzer Doppelstrang das Reaktionszentrum bildet. Selbstreplikation konnte durch die Einbeziehung eines zum ersten Sondenpaar komplementären zweiten Paares erreicht werden. Um den Zugang zum Templat nach erfolgter Reaktion für neue Reaktanden zu erleichtern, wurde ein Thermozyklierungsprotokoll zur intermediären Denaturierung des Produkt-Templat-Komplexes verwendet. Das System konnte so ca. 30 Katalysezyklen durchlaufen.

Kool und Mitarbeiter berichteten über eine templatkontrollierte Umsetzung eines 3'-Phosphorothioats mit einem 5'-iodthymidinmodifizierten Oligonukleotid.<sup>[151,152]</sup> Das Ligationsprodukt entstand mit 60% Ausbeute nach 10 h Reaktionszeit. Im Gegensatz zu der von Letsinger *et al.* entwickelten Autoligationsmethode unterscheidet es sich von einer natürlichen Nukleinsäure nur durch die interne Phosphorthioesterbrücke. Die Einzelbasenspezifität  $S$  (berechnet aus dem Quotienten der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten an perfekt komplementärem und einzelbasenfehlpaarendem Templat) war mit  $S > 100$  groß, wenn sich die potentielle Fehlpaarungsstelle gegenüber der Mitte einer kurzen Nukleinsäuresonde befand. Damit ist die Sequenzspezifität ähnlich hoch wie bei von der T4-Ligase vermittelten, enzymatischen Verknüpfungsreaktionen.<sup>[153]</sup> Aus der im Ligationsprodukt gebildeten Phosphorthioestergruppe resultierte eine schwache Destabilisierung des Produkt-Templat-Komplexes.<sup>[154]</sup> Diese förderte in Gegenwart von substöchiometrischen Templatmengen ( $10^{-4}$  Äquiv.) den *turnover* der Reaktion, welche unter isothermen Bedingungen nach 24 h bis zu 40 Produktmoleküle pro Templat erzeugte.<sup>[155]</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verknüpfungsreaktion auch an PCR-amplifizierten DNA-Templaten abläuft. Diese mussten dazu erst denaturiert und anschließend auf eine Nylonmembran gebunden werden. In diesem heterogenen *slot-blot*-Verfahren ließ die lange Reaktionsdauer von 10 h allerdings keine rasche Detektion der Zielsequenz zu. Die Ausstattung der Sonden mit Fluorophoren, welche im Ligationsprodukt einem FRET unterliegen, ermöglichte das Auslesen der Umsetzung mittels Fluorometrie. Eine modifizierte Version dieses Ansatzes nutzt eine terminale Dabsyl-einheit als elektrophile Fluchtgruppe, die gleichzeitig als Fluoreszenzlöcher für einen sequenzintern installierten Fluoreszenzfarbstoff in **28** dient (Abbildung 6c).<sup>[156]</sup> Daher kommt es während der Reaktion mit **27** zu einem Anstieg der Emission im Produkt **29**, dessen Bildung in Echtzeit verfolgt werden kann. Mit den sogenannten QUAL-Sonden (QUAL = *quenched autoligation*) wurde die Adressierbarkeit von ribosomaler RNA (rRNA) in Bakterienzellen<sup>[157–160]</sup> und unter Einbeziehung eines FRET-Systems zur Verminderung des Hintergrundsignals auch von mRNA in menschlichen Zellen<sup>[161]</sup> demonstriert. Weitere Modifikationen wie die Anbringung von zwei Löschereinheiten an der elektrophilen

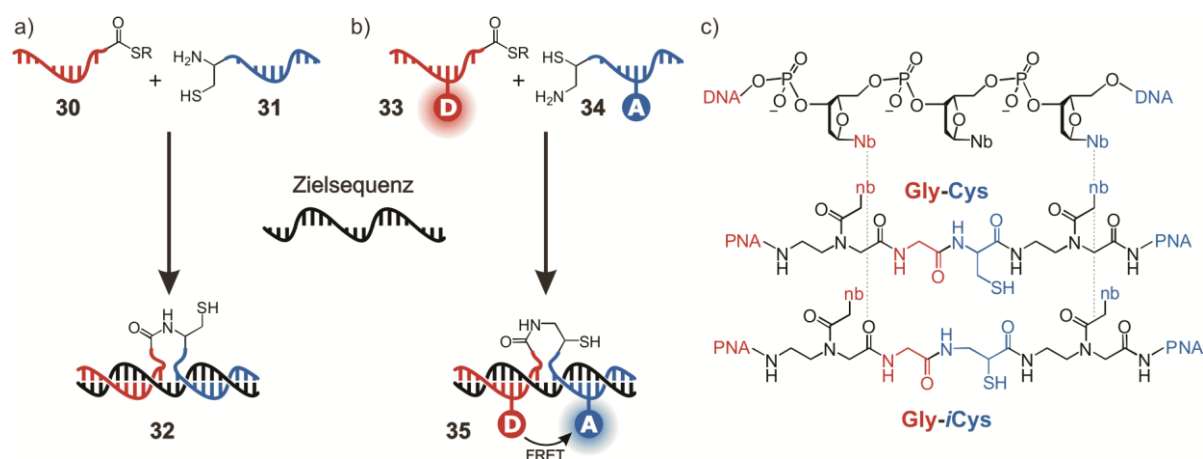
Sonde<sup>[162]</sup> und die Nutzung von zwei nukleophilen Sonden in einem Sandwichformat<sup>[163]</sup> führten zu einer weiteren Steigerung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses. Um die katalytische Aktivität des Templots zu erhöhen, wurde an der Verknüpfungsstelle ein Butandiollinker eingefügt, welcher sich gegenüber einer ungepaarten Templatbase befand. Die dadurch gesteigerte Flexibilität an der Verknüpfungsstelle ging mit einer starken Destabilisierung des Produktduplexes einher und konnte den katalytischen Umsatz der QUAL-Sonden nach 24 h auf bis zu 92 Produktmoleküle pro Templat steigern.<sup>[164]</sup> Abe und Ito demonstrierten, dass die von Kool entwickelte Phosphorothioat→Iodid-Substitution mit zusätzlicher Thermozyklisierung an RNA-Templaten ähnlich effektiv katalysiert wird. So konnten nach 100 Thermozyklen 60 Produktmoleküle pro Templat detektiert werden, wobei die Reaktion nur 100 min in Anspruch nahm.

Mattes und Seitz stellten 1999 einen Ansatz für das Auslesen einer Verknüpfungsreaktion über MALDI/TOF-Massenspektrometrie (MALDI/TOF-MS) vor.<sup>[165]</sup> Sie bedienten sich der im Gegensatz zu DNAs im Massenspektrometer hervorragend ionisierbaren PNAs als Nukleinsäuresonden zur carbodiimidvermittelten Verknüpfung an PNA- und DNA-Templaten. Die Einführung einer ungepaarten Templatbase an der Verknüpfungsstelle, welche nach erfolgter Ligation durch ein isosteres Gly-Gly-Dipeptid komplementiert wird, erwies sich als vorteilhaft bezüglich der Einzelbasenspezifität der Reaktion. Die Ähnlichkeiten im chemischen Aufbau von PNAs und Peptiden ermöglichte auch die Implementierung eines aus der chemischen Proteinsynthese bekannten Konjugationsverfahrens. Schon 1953 erkannten Wieland und Mitarbeiter, dass in einer leicht alkalischen, wässrigen Lösung eines Valinyl-Phenylthioesters in Gegenwart von Cystein rasch und in hohen Ausbeuten das entsprechende Val-Cys-Dipeptid gebildet wurde, während schwefelfreie Aminosäuren mit demselben Elektrophil nur Spuren oder gar keine peptidischen Produkte lieferten.<sup>[166]</sup> Sie schlussfolgerten, dass die Mercaptofunktion des Cysteins eine Umthioesterung (Thiolaustausch) einleitet, wobei das entsprechende S-acylierte Cystein entsteht. In einer sehr schnellen, nachgelagerten Reaktion wird der Acylrest intramolekular über ein fünfgliedriges, zyklisches Intermediat auf die Aminogruppe des Cysteins übertragen. Fast 40 Jahre später entwickelten Dawson und Kent *et al.* eine auf der S→N-Acylwanderung beruhende Methode zur chemischen Verknüpfung von Peptidylthioestern mit N-terminalen Cysteinylopeptiden.<sup>[167]</sup> Die sogenannte *native chemical ligation* (NCL, native chemische Verknüpfung) ist äußerst chemoselektiv und erlaubt die Verwendung von ungeschützten Peptidfragmenten in wässrigem Reaktionsmedium. Durch die Variation der Thioesterreaktivität kann die Reaktionsgeschwindigkeit leicht beeinflusst werden. Die Reversibilität der Umthioesterung



gestattet die *in situ*-Generierung reaktiver Thioester aus weniger reaktiven Vorläufern durch einen Überschuss des entsprechenden Thiols im Reaktionspuffer.<sup>[168]</sup> 1996 wurden erstmals in einer der NCL ähnlichen, nukleinsäuretemplatkontrollierten Reaktion DNA und Peptide zu den entsprechenden Chimären verknüpft.<sup>[169]</sup> Als Elektrophil diente ein Peptidyl-DNA-Thioester, dessen Peptidfragment auf eine am Templat benachbart hybridisierte 3'-Amino-DNA übertragen wurde. Es fehlte allerdings die für eine NCL erforderliche vicinale Aminothiolstruktur des Nukleophils, wodurch die Reaktion nur sehr langsam fortschritt (85% Ausbeute nach 15 h).

Mattes und Seitz verglichen carbodiimidvermittelte Verknüpfungsreaktionen von PNA-Glycinkonjugaten mit der nativen chemischen Verknüpfung von PNA-Glycylthioestern **30** und Cysteinyl-PNAs **31** an PNA-Templaten (Abbildung 7a).<sup>[170]</sup> Während die zuerst genannte Methode selbst nach 24 h weniger als 40% Ausbeute einbrachte, entstand während der NCL eine vergleichbare Menge des Verknüpfungsprodukts **32** schon nach einigen Minuten. Die nur leicht verlangsamten Reaktionen in Abwesenheit des Templats sowie in Gegenwart von einzelbasenfehlpaarendem Templat konnten durch eine Reduzierung der Sondenkonzentration von 160  $\mu\text{M}$  auf 1  $\mu\text{M}$  deutlich zurückgedrängt werden. So lieferte eine von Ficht, Dose und Seitz<sup>[171]</sup> beschriebene Verknüpfungsreaktion, bei der die Reaktanden im ternären Komplex durch eine ungepaarte Templatbase separiert waren, mit einzelbasenfehlpaarendem Templat nach 60 min kein Produkt. Auch die templatunabhängige Hintergrundreaktion war ineffektiv. Dem gegenüber standen 76% Ausbeute in Gegenwart des komplementären DNA-Templats. Besonders bemerkenswert sind die 20% Verknüpfungsprodukt nach nur 90 s Reaktionszeit,



**Abbildung 7:** a) Cysteinvermittelte native chemische PNA-Verknüpfung (PNA-NCL). b) Isocysteinvermittelte PNA-NCL mit Fluoreszenzdetektion des Verknüpfungsprodukts über FRET. c) Verknüpfungsprodukte aus PNA-Glycylthioestern und Cysteinyl- bzw. Isocysteinyl-PNAs mit Basenlücke gegenüber einer ungepaarten Templatbase (A = FRET-Akzeptor, D = FRET-Donor).

woraus eine pseudo-Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von  $2470 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$  resultiert. Aus dem Vergleich der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ergab sich eine Einzelbasenspezifität von  $S > 3450$ . Damit gehört die templatgesteuerte native chemische PNA-Verknüpfung zu den schnellsten und selektivsten chemischen Verknüpfungsmethoden und erzielt ähnliche Einzelbasenspezifitäten wie die hochselektive *Tth*-Ligase.<sup>[172]</sup> Interessanterweise wurden bei Ligationen an Templaten ohne ungepaarte Base geringere Einzelbasenspezifitäten beobachtet ( $S = 7\text{--}272$ ). Ursächlich hierfür ist vermutlich die Kooperativität der Basenstapelwechselwirkung im ternären Komplex, die sich negativ auf die Hybridisierungsspezifität der Cysteinyl-PNA auswirkt.

In den bisher behandelten Verknüpfungsreaktionen wurden zumeist einzelsträngige Template verwendet. Während RNA als Einzelstrang vorliegt, ist die natürliche Form der DNA der Doppelstrang. Es wäre demnach vorteilhaft, dsDNA als Templat zu adressieren, ohne dabei auf zeitintensive heterogene *assays*<sup>[155]</sup> oder sequenzbeschränkende Tripelhelixbildung<sup>[138]</sup> zurückzugreifen. Ficht *et al.*<sup>[173]</sup> beschrieben eine Methode für die templatkontrollierte native chemische PNA-Verknüpfung an PCR-amplifizierter dsDNA. Zur intermediären Denaturierung des doppelsträngigen Templats nutzten sie Thermozyklierung. Die relativ lange PNA-Thioestersonde und eine zusätzliche Blocker-PNA hielten während des raschen Abkühlens ein für die Bindung der kürzeren und daher einzelbasenspezifisch bindenden Cysteinyl-PNA ausreichend langes Templatsegment offen. Die dadurch verlangsamte Templatrehybridisierung ließ der schnell ablaufenden Ligation genug Zeit, um für eine MALDI/TOF-MS-Analyse ausreichende Mengen des Produkts zu bilden. Der Versuch einer carbodiimidvermittelten Verknüpfung scheiterte aufgrund der zu geringen Geschwindigkeit der Ligation sowie der Inkompatibilität des Aktivierungsreagenzes mit den zur Denaturierung benötigten hohen Temperaturen. Die eingesetzten PNA-Glycylthioester waren dagegen gegenüber der Hydrolyse bei pH 7.4 und 40 °C relativ stabil (8.5% Hydrolyseprodukt nach 2 h). Allerdings wurden während der Thermozyklierung Temperaturen bis 80 °C erreicht, was auf eine wesentlich stärkere Hydrolyse schließen lässt. In der Tat wurden bei 60 °C nach 2 h schon ca. 50% Hydrolyse der Thioester beobachtet.<sup>[174]</sup> Die eingesetzten PNA-Thioester sind demnach für einen Einsatz bei erhöhten Temperaturen nicht optimal geeignet.

Die native chemische PNA-Verknüpfung wurde auch hinsichtlich der katalytischen Umsetzung an substöchiometrischen Templatmengen untersucht.<sup>[175]</sup> Die Zahl der pro Templatmolekül gebildeten Produktmoleküle konnte von 51 auf bis zu 226 gesteigert werden, wenn als nukleophile Reaktionspartner von PNA-Glycylthioestern an Stelle von Cysteinyl-

PNAs Isocysteiny-PNAs (*i*Cys-PNA) eingesetzt wurden. Während die Lücke gegenüber der ungepaarten Templatbase im Produkt der Gly-Cys-Ligation durch ein zum Ribosephosphatrückgrat isosteres Dipeptid ausgefüllt wird, ist dieses im Gly-*i*Cys-Produkt um eine  $\sigma$ -Bindung verlängert (Abbildung 7c). Wie schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde,<sup>[148,149,164]</sup> führte die Erhöhung der Flexibilität zu einer Destabilisierung des Produkt-Templat-Komplexes, welche die Verdrängung des Produkts durch frische Reaktanden förderte. Zusätzlich wurde dies durch den hohen Überschuss der PNA-Sonden (10  $\mu$ M) bezüglich des DNA-Templats (1 nM,  $10^{-4}$  Äquiv.) begünstigt. Ein weiterer Vorteil der *i*Cys-vermittelten Verknüpfung ist die verminderte Hintergrundrate, die im Vergleich zur entsprechenden Cys-vermittelten Reaktion um den Faktor 4 kleiner war. Das sekundäre Thiol des Isocysteins ist aus elektronischen und sterischen Gründen weniger nukleophil als das primäre Thiol des Cysteins und verlangsamt den geschwindigkeitsbestimmenden Thiolaustausch der NCL. Überraschenderweise wirkte sich dieser Effekt nicht negativ auf die Reaktionsgeschwindigkeit am komplementären Templat aus. Auch die Einzelbasenspezifitäten beider Ligationen erwiesen sich als identisch.

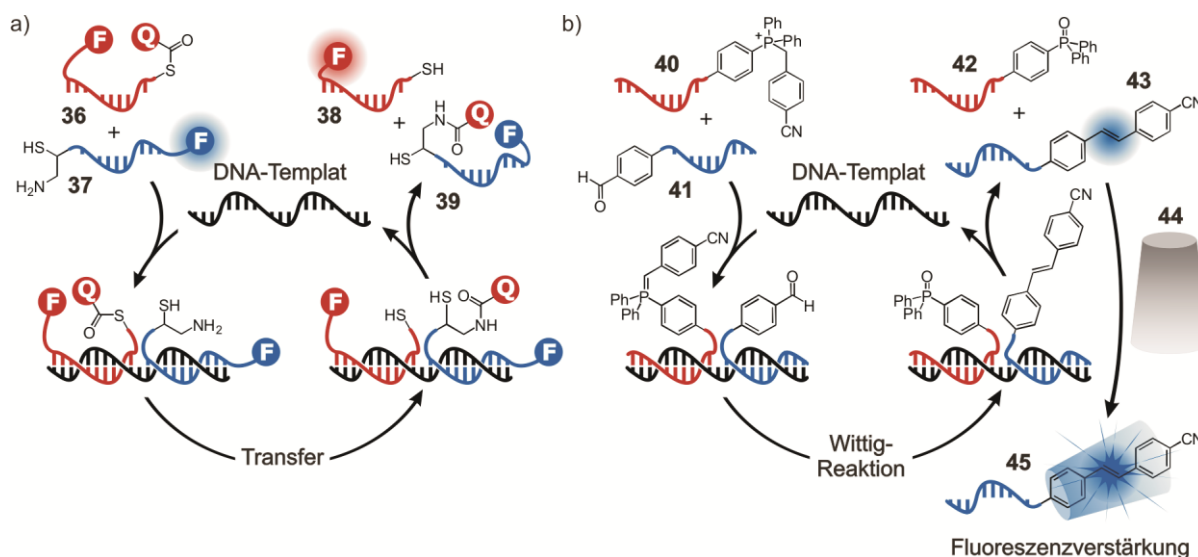
Um eine Echtzeitdetektion der Verknüpfungsreaktion zu ermöglichen, wurden die Sonden **33** und **34** mit Carboxyfluorescein (FAM) bzw. Carboxytetramethylrhodamin (TMR) ausgestattet (Abbildung 7b).<sup>[65,175]</sup> Im Produktduplex **35** unterliegen diese einem FRET, der über die Verminderung der Donoremmission und den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz ausgelesen werden kann. Bemerkenswert ist der für dieses FRET-Paar sehr hohe, 9-fache Signalanstieg nach 60 min Umsetzung in Gegenwart des komplementären Templats, welcher sich aus dem Verhältnis von Akzeptor- zu Donorfluoreszenz vor und nach erfolgter Reaktion berechnet.

In den letzten Jahren lieferte das sich rasch entwickelnde Gebiet der biokompatiblen Konjugationschemie<sup>[176–180]</sup> viele neue Ligationsvarianten, die in einem nukleinsäuretemplatgesteuerten Format die Detektion des Ligationsprodukts über Fluorometrie gestatten. Beispiele sind Cu(I)-katalysierte (3+2)-Cycloadditionen („Click“-Reaktionen) zwischen azid- und alkinmodifizierten Oligonukleotiden<sup>[181,182]</sup> oder Diels-Alder-Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf zwischen tetrazin- und cyclopropenderivatisierten DNA-Sonden.<sup>[183]</sup> Auch andere Reaktionstypen wie die Aldolkondensation oder die Heck-Reaktion fanden in templatkontrollierten *de novo*-Synthesen von Hemicyaninfarbstoffen durch die Umsetzung von aldehyd- und indolinmodifizierten DNAs und PNAs<sup>[184–186]</sup> bzw. Dehalogenierungen von Iod-BODIPY-markierten Nukleinsäuren mit Alkenyl-DNAs<sup>[187]</sup> Verwendung. Da jedoch bei Ligationsreaktionen die katalytische Umsetzung am Templat unabhängig von der

verwendeten Verknüpfungsschemie durch die hohen Templataffinitäten der Ligationsprodukte inhibiert wird, wurden verschiedene Reaktionsformate entwickelt, die nicht zu einer Verknüpfung der reaktiven Sonden führen. Im Folgenden werden einige dieser Konzepte vorgestellt.

### Nukleinsäuretemplatgesteuerte Transferreaktionen

Eine Möglichkeit zur Umsetzung zweier Oligonukleotidkonjugate in einer templatgesteuerten Reaktion, ohne dabei deren Länge und damit die Templataffinität zu erhöhen, stellt die Übertragung von chemischen Gruppen von einer Eduktsonde auf eine zweite dar. Dieses Konzept des templatkontrollierten Transfers wurde erstmals 2006 von Grossmann und Seitz beschrieben.<sup>[188]</sup> Die benachbarte Hybridisierung einer FAM-markierten PNA-Thioestersonde **36** und einer TMR-markierten Isocysteiny-PNA **37** leitet eine auf dem Prinzip der NCL basierende Reaktion ein (Abbildung 8a). Im Gegensatz zur nativen chemischen PNA-Verknüpfung kommt es jedoch aufgrund der Vertauschung des Acyl- und Thiolsegments in **36** nicht zu einer Ligation beider Reaktanden. Vielmehr wird der fluoreszenzlöschende Dabcylrest auf **37** übertragen, wodurch die FAM-Emission im Produkt **38** ansteigt und die TMR-Fluoreszenz von **39** gelöscht wird. Die Reaktion zeichnete sich durch einen 17-fachen Anstieg des FAM/TMR-Fluoreszenzintensitätenverhältnisses nach 90 min Reaktion in Gegenwart des komplementären Templats und eine Einzelbasenspezifität von  $S = 44$  aus. Zudem führten substöchiometrische Templatkonzentrationen von 10 pM ( $10^{-5}$  Äquiv.) noch zu einem detektierbaren Signal, wobei ein Templatmolekül die Bildung von bis zu 402 Produktmolekülen förderte. Damit ist die katalytische Aktivität des Templats größer und die Empfindlichkeit höher als für die zuvor beschriebenen Ligationsreaktionen. Neben Fluoreszenzlöschern wurden auch Pyreneinheiten auf PNAs, die mit einem zweiten Pyrenmolekül ausgestattet waren, übertragen.<sup>[189]</sup> Da nur der templatgesteuerte Transfer, nicht aber die Hydrolyse der Reportergruppe zur Bildung eines Pyrenexcimers im Transferprodukt führte, konnte eine wichtige Quelle für unspezifische Hintergrundsignale eliminiert werden. Dass Transferreaktionen auch für die RNA-Detektion geeignet sind, wurde eindrucksvoll an einem Segment aus der RNA des HI-Virus gezeigt.<sup>[190]</sup> Dabei wurde der RNA-templat-katalysierte Transfer eines Biotinmoleküls mit einer zweiten, enzymatischen Amplifizierung gekoppelt. Nur bei erfolgreichem Biotintransfer konnte ein Streptavidin-Meerrettich-peroxidasekonjugat das über eine Hexahistidineinheit immobilisierte Transferprodukt binden. Die anschließende, enzymkatalysierte Umwandlung von Tetramethylbenzidin in das entsprechende chinoide Produkt ließ sich durch dessen Absorption im sichtbaren Bereich des



**Abbildung 8:** a) NCL-basierter Transfer eines Fluoreszenzlöschers Q (F = Fluorophor). b) *De novo*-Synthese eines Stilbenfluorophors über einen Wittig-Transfer mit anschließender Fluoreszenzverstärkung.

Spektrums auslesen. Das Detektionslimit bezüglich des RNA-Templats betrug 500 amol, was in dem verwendeten Reaktionsvolumen einer Konzentration von 10 pM entspricht.

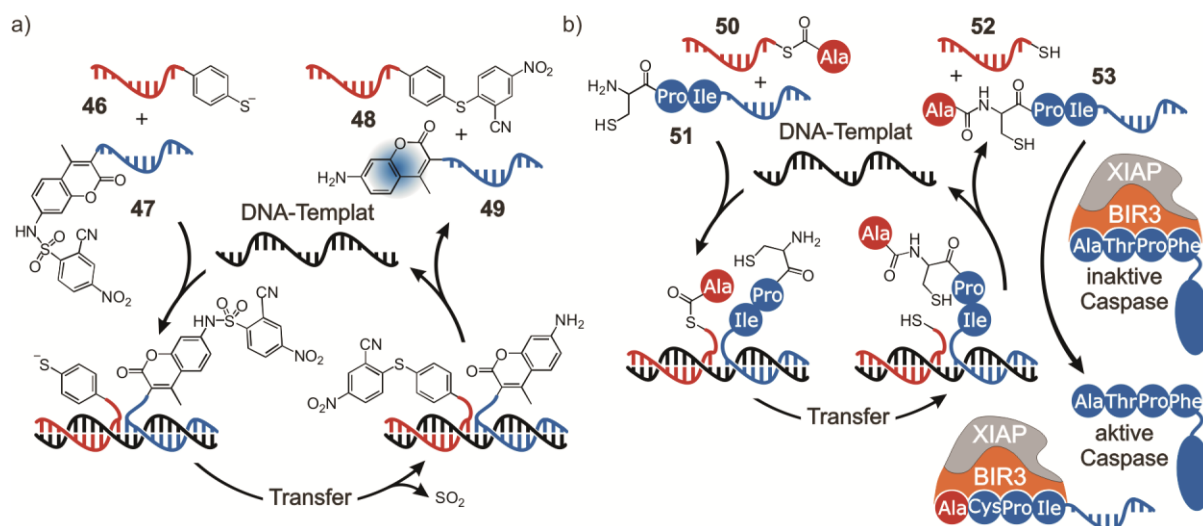
In den zuvor beschriebenen Transferreaktionen kamen PNA-Sonden mit ungeladenem Rückgrat zum Einsatz. Das negativ geladene Rückgrat von DNA-Konjugaten bietet hingegen die Möglichkeit, den Strangaustausch an komplementären Nukleinsäuren durch den Zusatz von kationischen Polymeren zu beschleunigen.<sup>[191]</sup> Michaelis, Maruyama und Seitz nutzten kürzlich diese Eigenschaft, um die Verdrängung der aus zwei DNA-Oligonukleotidsonden gebildeten Produkte vom DNA-Templat durch frische Reaktanden zu forcieren.<sup>[192]</sup> In Gegenwart eines kammartigen Kopolymers, welches aus einem Lysinrückgrat mit Dextran-seitenketten aufgebaut war, wurden pro Templatmolekül bis zu 29 FAM-Fluorophore zwischen den DNA-Sonden übertragen. In Abwesenheit des Kopolymers konnte dagegen keine katalytische Aktivität des Templats nachgewiesen werden.

Eine von Chen *et al.* vorgestellte templatkontrollierte Umsetzung nutzt den inhärenten Transferschritt der Wittig-Reaktion und führt zur Übertragung des 4-Cyanobenzylidenrests aus einem DNA-gebundenen Phosphoniumsalz **40** auf einen DNA-verknüpften Benzaldehyd **41** (Abbildung 8b).<sup>[193]</sup> Das *de novo*-synthetisierte, fluoreszente Stilben in **43** kann durch einen Rezeptor wie  $\alpha$ -Cyclodextrin (**44**) eingeschlossen werden. Dies schließt Reaktionskanäle der strahlungslosen Deaktivierung und bewirkte eine bis zu 30-fache Verstärkung der Stilbenemission im Einschlusskomplex **45**. Durch die Kombination von Templatkatalyse und Signalamplifizierung konnten über 100-fache Fluoreszenzanstiege in Gegenwart von 0.1

Äquiv. des DNA-Templats (20 nM) erzielt werden. Die Nachweisgrenze lag bei einer Konzentration von 40 pM. Außerdem lief die Reaktion auch an dsDNA-Templaten ab, wenn Thermozyklisierung zur intermediären Bildung von Einzelstrangsegmenten verwendet wurde. Ein Überschuss an Oligonukleotidprimern verlangsamte dabei die Rückbildung des Templatdoppelstrangs.

Kürzlich wurde von Shibata *et al.* der templatgesteuerte Transfer einer mit einem Cumarin verknüpften 2-Cyano-4-nitrobenzosulfonyllöschereinheit von einem DNA-Oligomer **47** auf eine 3'-thiophenolatfunktionalisierte DNA-Sonde **46** demonstriert (Abbildung 9a).<sup>[194]</sup> Die sehr schnelle Reaktion folgt dem Mechanismus der nukleophilen, aromatischen Substitution ( $S_NAr$ ) und ergab in Gegenwart von stöchiometrischen Templatkonzentrationen nach nur 30 s eine Ausbeute von 67%. Der templatunabhängige Hintergrundtransfer war selbst nach 30 min vernachlässigbar. Die effektive Fluoreszenzlöschung im Edukt **47** und die hohe Quantenausbeute (0.64)<sup>[195]</sup> des fluoreszenten 7-Aminocumarinfluorophors in **49** ermöglichte dessen Detektion bei sehr geringen Konzentrationen. So erzeugten 500 fM Templat ( $10^{-5}$  Äquiv.) noch ein detektierbares Signal, was einem katalytischen Umsatz von 1500 Eduktmolekülen pro Templat entspricht. Dieses Detektionslimit ist das bislang geringste für eine Reaktion, die auf der Templatkatalyse als einzigem Amplifizierungsmechanismus beruht. Der Schlüssel dafür liegt den Autoren zufolge in der außerordentlich hohen Geschwindigkeit der templatgesteuerten Reaktion, die vergleichbar mit der Dissoziationsrate der Oligonukleotidkonjugate vom Templat ist. Bisherige Reaktionen verliefen dagegen um mehrere Größenordnungen langsamer.

Templatgesteuerte Transferreaktionen bieten neben der Nukleinsäuredetektion auch Möglichkeiten zum Aufbau von bioaktiven Molekülen als Folge des Vorliegens einer bestimmten, mit einer Krankheit assoziierten Nukleinsäuresequenz. Erben *et al.* nutzten den einzelbasenspezifischen Transfer eines PNA-gebundenen Alanylrests in **50** auf eine Peptidyl-PNA **51**, um ein proapoptotisches PNA-Peptidkonjugat **53** zu erzeugen (Abbildung 9b).<sup>[196,197]</sup> Nur das alanintragende Volllängenpeptid stellt einen potenten Binder für die BIR3-Domäne des *X-linked inhibitor of apoptosis proteins* (XIAP) dar, welches in mehreren Tumorvarianten überexprimiert wird.<sup>[198]</sup> XIAP bindet und inhibiert eine in die Apoptose involvierte Protease (Caspase-9), welche durch das Transferprodukt aus der BIR3-Domäne verdrängt wird. Wurde die Transferreaktion in Gegenwart des komplementären Templats in mit BIR3 versetztem Zelllysate durchgeführt, konnten bis zu 27% der Caspase-9-Aktivität (47% der Aktivität der nachgeschalteten Caspase-3) wiederhergestellt werden, wohingegen ein einzelbasenfehl-



**Abbildung 9:** a) Transfer eines Fluoreszenzlösers über nukleophile aromatische Substitution. b) NCL-basierter Alanyltransfer zur Erzeugung eines proapoptotischen Peptids, welches eine Caspase aktiviert.

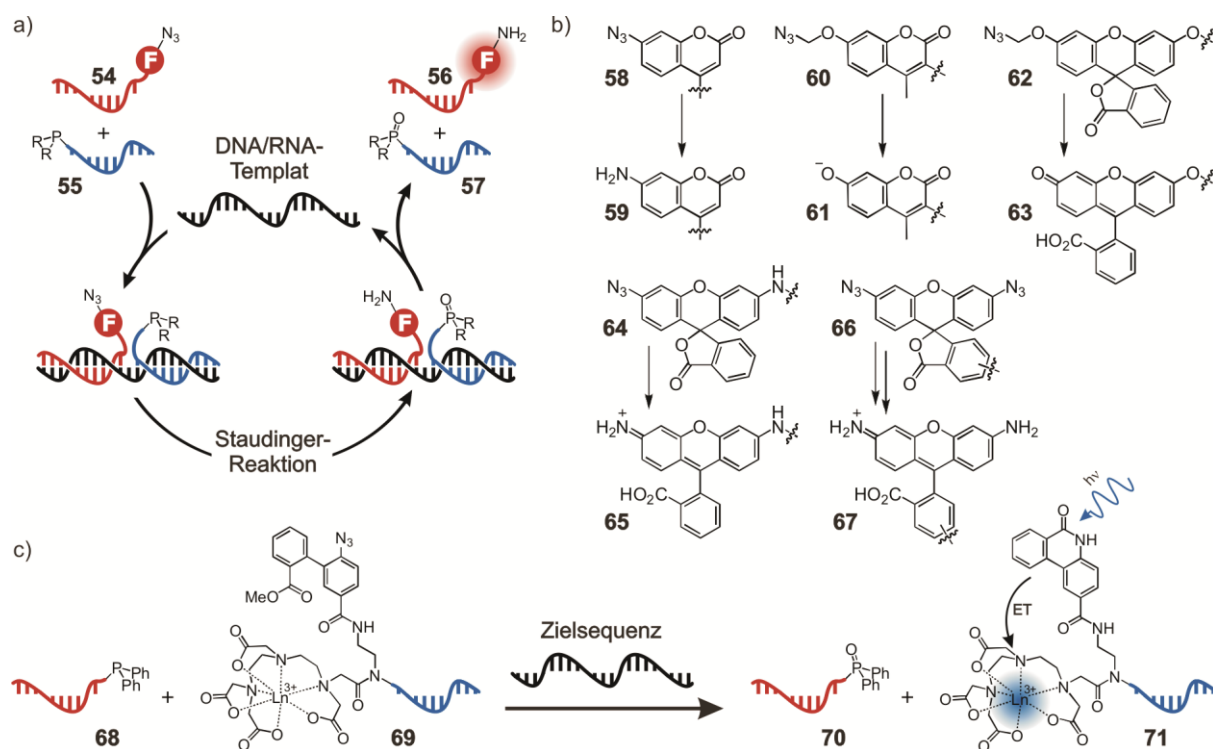
paarendes Templat keine Aktivitätssteigerung bewirkte. Damit konnte die Existenz einer bestimmten Nukleinsäuresequenz mit der Erzeugung eines proapoptotischen Signals verknüpft werden. Dieser Ansatz ist besonders für das Gebiet der genotypspezifischen Medizin von Interesse.

### Nukleinsäuretemplatgesteuerte Stickstofffreisetzungsreaktionen

Die Reduktion organischer Azide zu den entsprechenden Aminen ist durch die Freisetzung von gasförmigem Stickstoff begleitet, weshalb diese Umsetzungen irreversibel und entropisch begünstigt sind. Eine in neuerer Zeit häufig verwendete Stickstofffreisetzungsreaktion in der templatgesteuerten Chemie ist die Staudinger-Reaktion. Schon im Jahr 1919 berichteten Staudinger und Meyer über die „lebhaft“e Umsetzung von Phenylazid und Triphenylphosphin zum entsprechenden Phosphazid, welches sofort unter Stickstoffabspaltung in das Phosphiniminderivat überging.<sup>[199]</sup> Dessen Hydrolyse lieferte schließlich Phenylamin und Triphenylphosphinoxid.

Taylor und Mitarbeiter nutzten 2004 erstmals die von Saxon und Bertozzi<sup>[200]</sup> entwickelte Variante der Staudinger-Reaktion, die Staudinger-Ligation, um die Emission eines Triphenylphosphin(TPP)-gelöschten Fluorescein-PNA-Konjugats durch die Reaktion mit einer zweiten, azidylierten PNA-Sonde in einer DNA-templatkontrollierten Umsetzung zu aktivieren.<sup>[201]</sup> Durch die Fluoreszenz des Produkts konnte dessen Bildung in Echtzeit verfolgt werden. Die Reaktion war 188-fach schneller als in Abwesenheit des Templats und durch Einzelbasenspezifitäten von  $S = 31\text{--}37$  gekennzeichnet. In den folgenden Jahren wurden eine

Reihe von templatgesteuerten Staudinger-Reaktionen beschrieben, bei denen die Umsetzung von nukleinsäuregebundenen, azidgelöschten Fluorophoren (**54**) mit phosphinkonjugierten Oligonukleotiden (**55**) zur Bildung von fluoreszenten Produkten (**56**) führten (Abbildung 10a, b). Pianowski und Winssiger stellten die durch eine TPP-PNA vermittelte Reduktion eines PNA-gebundenen 7-Azidocumarins **58** vor.<sup>[202]</sup> Die Reaktion lieferte in Gegenwart von 0.01 Äquiv. des DNA-Templats (5 nM) 20% Ausbeute an fluoreszentem Produkt **59** nach 30 min. Außerdem wurde mit verkürzten Sonden nach 15 min eine bis zu 10-fache Diskriminierung des Fluoreszenzanstiegs durch einzelbasenfehlpaarende DNA beobachtet. Abe, Ito und Mitarbeiter nutzten in ähnlichen Reaktionen azidgelöschte Rhodamine.<sup>[203,204]</sup> Durch die Verwendung zweier unterschiedlich emittierender Derivate konnten sie eine Zwei-Farben-Detektion von einzelbasendivergierenden DNA-Templaten erreichen. Franzini und Kool<sup>[205]</sup> sowie Furukawa *et al.*<sup>[206]</sup> beschrieben unabhängig voneinander Systeme, in denen der phosphinvermittelte Zerfall von azidomethoxysubstituierten Profluorophoren **60** und **62** die entsprechenden fluoreszenten Hydroxyverbindungen **61** und **63** lieferte. Diese entstanden durch die Hydrolyse der intermediär gebildeten Halbaminale. Die Konjugate konnten durch Permeabilisierung mit Streptolysin O (SLO) in lebenden Zellen eingeschleust und die templatgesteuerte Reaktion zur Lokalisierung und Quantifizierung von zellulärer rRNA und



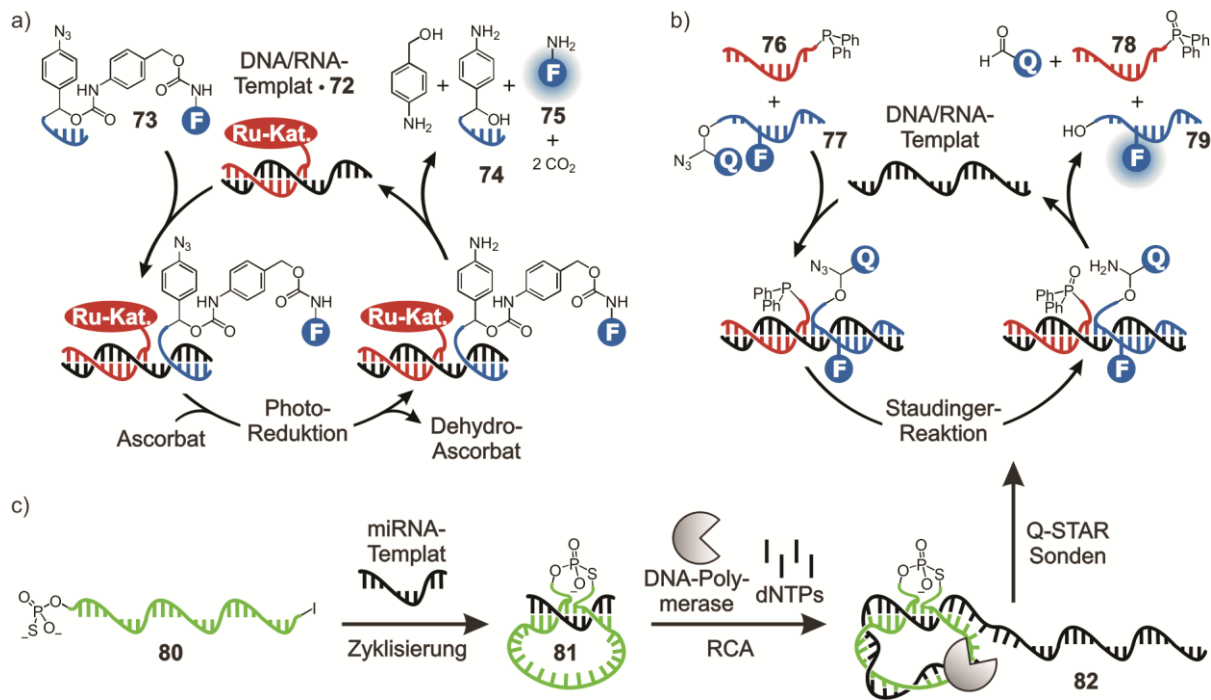
**Abbildung 10:** a) Prinzip der nukleinsäurekatalysierten Staudinger-Reaktion zur Aktivierung azidgelöschter Fluorophore. b) Darstellung einiger profluoreszenter Derivate und deren emittierender Produkte. c) Templatgesteuerte, luminogene Staudinger-Reaktion (ET = Energietransfer).



mRNA eingesetzt werden.<sup>[206]</sup> Pianowski *et al.* verwendeten GPNA-basierte Sonden, welche Zellmembranen ohne die Hilfe von Transfektionsreagenzien passieren können.<sup>[207]</sup> Die mRNA-templatkontrollierte Reduktion des Azidorhodaminkonjugats **64** verlief in HEK-Zellen einzelbasenspezifisch und ermöglichte die Visualisierung der Zielsequenzen im Zytosol. Eine Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses konnte durch die Installation einer zweiten Azideinheit am Rhodamin **66** erzielt werden.<sup>[208]</sup> Erst die Reaktion mit zwei Phosphinsonden ergibt den fluoreszenten Farbstoff **67**, wobei die Wahrscheinlichkeit für solch eine Umsetzung in Abwesenheit des Templats gering ist. Die Adressierung von zellulären microRNAs (miRNAs) demonstrierte abermals die Biokompatibilität der templatgesteuerten Staudinger-Reaktion. Durch das Auslesen der *in cellulo*-Reaktion mittels Durchflusszytometrie konnte auf eine Fixierung der Zellen verzichtet werden. Trotzdem kann die Autofluoreszenz von zellulären Komponenten bei Messungen stören. Saneyoshi, Abe und Ito stellten kürzlich eine luminogene Staudinger-Reaktion vor, die dieses Problem umgeht (Abbildung 10c).<sup>[209]</sup> Eine TPP-DNA **68** wandelt den azidmaskierten Antennenvorläufer **69** in einer templatkontrollierten Reaktion in das entsprechende Amin um. Der nachfolgende intramolekulare Ringschluss über die Bildung des Laktams generiert die aktive 6(5*H*)-Phenanthridinonantenne in **71**, die nach Anregung bei 340 nm Energie auf den benachbarten Lanthanoid-Komplex überträgt. Die Lebensdauer der resultierenden Lanthanid-lumineszenz liegt im Bereich von Millisekunden, was die Ausblendung kurzlebiger Autofluoreszenz biologischen Ursprungs durch zeitverzögertes Auslesen gestattet. Die luminogene Reaktion, welche einzelbasenspezifisch und mit katalytischen Templatmengen ablief, wurde erfolgreich in Zellsuspensionen an rRNA-Templaten von *E. coli*-Bakterien getestet.

Ein bei Staudinger-Reaktionen häufig auftretendes Problem ist die Anfälligkeit der Phosphinkonjugate für die Oxidation mit Luftsauerstoff. Für gewöhnlich werden diese daher im Überschuss eingesetzt, was jedoch die Hintergrundreaktion begünstigt. Die oxidierten Sonden können außerdem mit den intakten Reaktanden um die Templatbindung konkurrieren, was der Templatkatalyse entgegenwirkt. Anstelle eines Phosphins wurde von Winssinger und Mitarbeitern ein GPNA-gebundener Ruthenium(II)-Komplex zur photokatalytischen Reduktion einer Azidocumarin-GPNA verwendet.<sup>[210]</sup> Das Rutheniumkonjugat kann nach erfolgter Reaktion am Templat verbleiben und wird durch im Puffer enthaltenes Ascorbat wieder reduziert. Dieses kann im Vergleich zu nukleinsäuregebundenen Reduktionsmitteln im hohen Überschuss eingesetzt werden, ohne eine Beschleunigung der templatunabhängigen Hintergrundreaktion zu bewirken. Ein veränderter Aufbau der azidylierten Sonde **73** macht es außerdem möglich, aus dieser einen Rhodaminfarbstoff **75** freizusetzen (Abbildung 11a).<sup>[211]</sup>

## 2. Stand der Forschung



**Abbildung 11:** Freisetzung von funktionalen Molekülen durch a) rutheniumkatalysierte Azid-Photoreduktion, b) Staudinger-Reaktion von Q-STAR-Sonden (F = Fluorophor, Q = Fluoreszenzlöcher). c) miRNA-templategesteuerte Zyklisierung mit anschließender RCA und Q-STAR-Detektion des RCA-Produkts.

**75** ist über ein Carbamat mit einem *p*-Aminobenzylalkohol verknüpft, welcher auf die gleiche Weise mit einem *p*-Azidobenzylalkohol verbunden ist. Durch die benachbarte Hybridisierung mit der Ruthenium-PNA **72** am Nukleinsäuretemplat und Bestrahlung bei 455 nm zerfällt das reduzierte Intermediat in das PNA-Konjugat **74**, das freie Rhodamin **75** sowie *p*-Aminobenzylalkohol und  $\text{CO}_2$ . Die Reaktion führte nach 24 h in Anwesenheit von 5 pM eines DNA-Templats ( $2 \cdot 10^{-5}$  Äquiv.) noch zu einem detektierbaren Signal. Somit förderte ein Templatmolekül die Freisetzung von mehr als 4000 Rhodaminmolekülen. Weiterhin wurde demonstriert, dass auch das zelluläre Redoxsystem des Zytosols die nötigen Reduktionsäquivalente bereitstellen kann. Zwei unterschiedliche miRNAs konnten in verschiedenen Zelllinien mittels der templat- und photokatalysierten Azidreduktion nachgewiesen werden. Neben Rhodamin wurden auch andere funktionelle Moleküle, wie beispielsweise Estradiol, über eine templatgesteuerte Staudinger-Reaktion freigesetzt.<sup>[212]</sup>

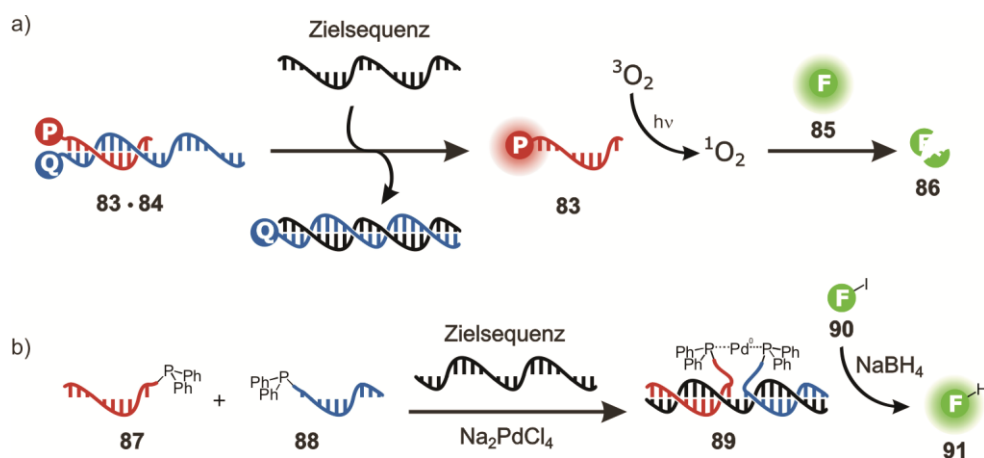
Zuvor berichteten bereits Franzini und Kool über eine Strategie zur templatkontrollierten Freisetzung eines über einen  $\alpha$ -Azidoether gebundenen Löschers aus einem fluoresceinmarkierten DNA-Konjugat **77** (Q-STAR, *quenched Staudinger-triggered  $\alpha$ -azido-ether release*, Abbildung 11b).<sup>[213]</sup> Das durch die Reduktion des Azids mit der 3'-TPP-DNA **76** gebildete Halbaminall entlässt den Dabsyllöcher als Imin in Lösung, welches anschließend

zum entsprechenden Aldehyd hydrolysiert. Die Reaktion lieferte in Gegenwart des komplementären DNA-Templats nach 32 min das fluoreszente Produkt **79** mit 90% Ausbeute und einen mehr als 60-fachen Fluoreszenzanstieg in weniger als 2 h. Auch mit substöchiometrischen Templatmengen (0.01 Äquiv., 2 nM) konnte nach 12 h ein ähnlich hohes Signal detektiert werden. Die Einzelbasenspezifität war mit  $S=120$  groß. Die Verwendung alternativ markierter Sonden ermöglichte die Unterscheidung von einzelnen Bakterienzellen, die in der Zielregion ihrer rRNA nur in einer Base voneinander abwichen.<sup>[213,214]</sup> Eine Steigerung der Einzelbasenspezifität und des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses ergab die Ausstattung der fluorogenen Sonde mit zwei Löschereinheiten, da hier zwei aufeinanderfolgende Reaktionen zur Aktivierung der Emission notwendig sind.<sup>[215]</sup> Um auch purinreiche dsDNA als Templat adressieren zu können, wurden Homopyrimidinsonden synthetisiert, welche über Hoogsten-Basenpaarung an das doppelsträngige Templat binden.<sup>[216]</sup> Die Reaktion musste allerdings im leicht sauren Milieu stattfinden (pH 5.6), da die Erkennung eines G–C-Paars ein protoniertes Cytosin ( $C^+$ ) erfordert. Alternativ konnte die Umsetzung im neutralen pH-Bereich erfolgen, wenn die Sonden Pseudoisocytosin ( $\psi C$ , ein neutrales Analogon von  $C^+$ ) enthielten. Eine Steigerung der Empfindlichkeit der Q-STAR-Detektion gelang kürzlich Harcourt und Kool,<sup>[217]</sup> indem sie der Reaktion eine enzymatische Amplifizierung des Templats vorschalteten (Abbildung 11c). Ähnlich dem Konzept der *padlock probes*<sup>[218]</sup> fungiert dabei das miRNA-Templat als Splint, welcher die Zyklisierung eines DNA-Konjugats **80** durch Thiol→Iodid-Substitution einleitet. Der Zyklus **81** dient nun ebenfalls als Templat für eine *rolling circle amplification* (RCA), bei der die zugesetzte  $\phi 29$  DNA-Polymerase lange, einzelsträngige DNA-Wiederholungssequenzen (**82**) synthetisiert. Da das miRNA-Templat selbst als Primer für die Polymerase fungiert (*target-primed RCA*), wird ohne dieses kein RCA-Produkt gebildet. **82** wird nun in einer templatkatalysierten Reaktion durch Q-STAR-Sonden detektiert, wodurch sich eine weitere Amplifizierungsebene eröffnet. Es wurde geschätzt, dass die RCA 188-fach und die Q-STAR-Reaktion nochmals 15-fach zur Gesamtamplifizierung beitrugen. Die Detektionsgrenze war in der Tat mit 200 pM geringer als für vorangegangene Umsetzungen mit Q-STAR-Sonden. Einzelbasenspezifität wurde mit einem fehlpaarenden miRNA-Templat demonstriert, welches ein 5-fach langsamer ansteigendes Fluoreszenzsignal erzeugte. Während Zyklisierung und RCA simultan abliefen, war es von Vorteil, die signalgenerierende Reaktion erst nach der RCA zu starten. Nachteilig sind die langen Inkubationszeiten der RCA von 24 h sowie die im Vergleich zur PCR nur lineare enzymatische Amplifizierung.

## Umsetzungen an nukleinsäuretemplataktivierten Katalysatoren

Schon vor der im letzten Abschnitt behandelten rutheniumkatalysierten Reduktion eines Azids an einem Nukleinsäuretemplat<sup>[210,211]</sup> wurden Reaktionen beschrieben, bei denen erst die Anwesenheit des Templats die Umsetzung von Substraten an Katalysatoren ermöglicht. In Pionierarbeiten demonstrierten Taylor und Mitarbeiter, dass die Hydrolyse von DNA/PNA-gebundenen *p*-Nitrophenyl-<sup>[219,220]</sup> oder Cumarinestern<sup>[221,222]</sup> durch katalytisch wirkende Imidazolylnukleinsäurekonjugate nur in Gegenwart von perfekt komplementären DNA/RNA-Templaten effizient abläuft. Später zeigten Graf *et al.*,<sup>[223]</sup> dass die templatinduzierte Freisetzung von komplexierten Cu(II)-Ionen aus einem bis-Terpyridin-DNA-Konjugat und deren Bindung an Phenanthrolin zum Aufbau eines aktiven Redoxkatalysators führt. Dieser erzeugte ein fluoreszentes Signal durch die Reduktion eines Profluorophors.

Die nukleinsäuregesteuerte Erzeugung von zytotoxischem Singulett-Sauerstoff wurde durch die Positionierung eines Pyropheophorbid-*a*-Photosensibilisators in der Nähe eines Löschers in einem Nukleinsäureduplex **83•84** erreicht (Abbildung 12a).<sup>[224,225]</sup> Durch Strangaustausch mit dem Templat wird **83** aus dem Duplex verdrängt und kann nun bei Bestrahlung mit rotem Licht  $^3\text{O}_2$  katalytisch in  $^1\text{O}_2$  umwandeln. Die Detektion erfolgte über den  $^1\text{O}_2$ -induzierten Zerfall eines 1,3-Diphenylisobenzofuranfluorophors **85**. Nach 100 min kam es zur Generierung von 512 Molekülen  $^1\text{O}_2$  pro Templatmolekül. Die Anbringung von Photosensibilisator- und Löschereinheit in einem haarnadelförmigen Oligonukleotid und dessen Öffnung durch das Templat konnte den Umsatz nach 45 h auf mehr als 6000  $^1\text{O}_2$ -Moleküle pro Templat erhöhen, wenn ein großer Überschuss ( $10^4$  Äquiv.) des Fluorophors vorlag. Für die Reaktion



**Abbildung 12:** a) Nukleinsäurekontrollierte Aktivierung eines Photosensibilisators (P) zur katalytischen Generierung von Singulett-Sauerstoff (F = Fluorophor, Q = Fluoreszenzlöcher). b) Nukleinsäuregesteuerter Aufbau eines aktiven Pd-Katalysators zur Deiodierung eines Profluorophors.

ergab sich eine Einzelbasenspezifität von  $S=6$ . Durch den Wechsel zu 2'-OMe-RNA-basierten Sonden gelang die Umsetzung auch an rRNA-Templaten in SLO-transfizierten Zellen. Dies stellt das erste Beispiel der Erzeugung einer zelltoxischen Spezies innerhalb lebender Zellen dar, die durch die Anwesenheit einer bestimmten Nukleinsäuresequenz kontrolliert wird. Dutta *et al.* verwendeten einen alternativen Eosin-Photosensibilisator, der bei Bestrahlung mit grünem Licht neben  $^1\text{O}_2$  auch andere hochreaktive Sauerstoffspezies generierte. In dieser oxidativen Umgebung konnte ein Profluorophor in einen fluoreszenten Farbstoff umgewandelt werden.<sup>[226]</sup> Dies hat den Vorteil, dass die Reaktion mit der Erzeugung eines Signals statt mit dessen Abklingen einhergeht. Ein alternativer Ansatz basiert auf der benachbarten Hybridisierung einer Photosensibilisatorsonde neben einem über einen  $^1\text{O}_2$ -sensitiven Linker an ein Oligonukleotid gebundenen, gelöschten Fluorophor.<sup>[227,228]</sup> Die Spaltung des Linkers durch den in unmittelbarer Nähe generierten Singulett-Sauerstoff führt dabei zur Freisetzung des fluoreszenten Farbstoffs.

Herrmann und Mitarbeiter stellten kürzlich eine auf einer zuvor entwickelten, fluorogenen Ligationsreaktion<sup>[187]</sup> aufbauende Deiodierungsreaktion vor. Während in der ersten Version ein in der Lösung enthaltender Palladiumkatalysator die oligonukleotidgebundenen Substrate in einer Heck-Reaktion verknüpfte, wird in dem neuen System der Katalysator *in situ* am Templat aufgebaut (Abbildung 12b).<sup>[229]</sup> Zwei terminal mit Triphenylphosphinliganden ausgestattete DNA-Sonden **87** und **88** bilden zusammen mit dem gelösten  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  wahrscheinlich eine aktive Palladium-bis-Phosphin-Spezies wie **89**, welche sich nur in Anwesenheit der komplementären Zielsequenz bildet. Durch zugesetztes  $\text{NaBH}_4$  wird dann in einer palladiumkatalysierten Reaktion der iodierte BODIPY-Profluorophor **90** in das fluoreszente Derivat **91** umgewandelt. Nach 4 min wurden in Gegenwart von 1 nM des DNA-Templats bereits 90% der maximalen Fluoreszenzintensität gemessen, während der Signalanstieg durch einzelbasenfehlpaarendes Templat 65-fach verlangsamt wurde oder in dessen Abwesenheit völlig ausblieb. Auch 10 pM des Templats generierten ein detektierbares Signal binnen Minuten, und das Detektionslimit lag bei 10 fM. Problematisch ist die mögliche Komplexierung des Palladiums durch die Nukleobasen der Sonden, weshalb die Reaktion bei erniedrigtem pH-Wert stattfinden muss. Des Weiteren ist eine genaue Anpassung der Konzentration des Substrats **90** an die des Templats erforderlich, was die Komplexität des Verfahrens bei einer Blindprobe erhöht. Außerdem ist eine potentielle Anwendung in biologischen Milieus durch die Affinität von Palladium zu Cystein erschwert, welches zu einer Vergiftung des Katalysators führen kann.

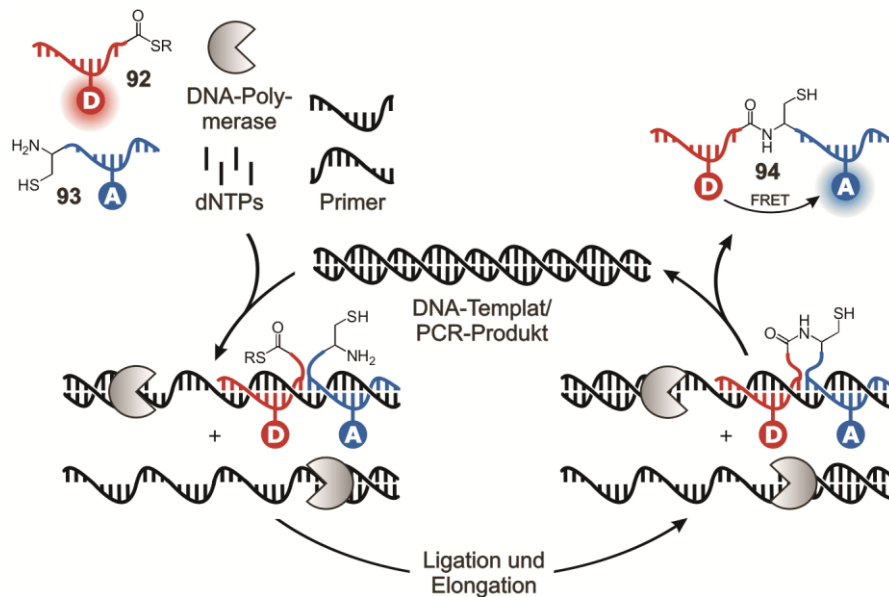
Im Gegensatz zu den templatkatalysierten Reaktionen bieten Systeme, die zur Aktivierung eines Katalysators durch ein Nukleinsäuretemplat führen, die Möglichkeit des *turnovers* in Gegenwart von stöchiometrischen Templatmengen. Die Substrate müssen nicht an Nukleinsäuren gebunden sein, weshalb die Produkte die Bildung des katalytischen Komplexes nicht inhibieren. Die katalytische Aktivität hängt somit nicht mehr von der Dissoziation der involvierten Nukleinsäuren ab. Ein weiterer Vorteil besteht in der prinzipiellen Möglichkeit, hochkonzentrierte Reaktanden einzusetzen. Während in templatgesteuerten Reaktionen lediglich die *effektive Molarität* der Reaktanden steigt, kommt es bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Systemen zu einer Erhöhung der *Konzentration* der katalytischen Spezies.

### 3. Zielsetzung

Reaktionen chemisch modifizierter Oligonukleotidsonden an Nukleinsäuretemplaten bieten die Möglichkeit der spezifischen Detektion von Zielsequenzen. Die Bildung der Reaktionsprodukte dient dabei als Indikator für die Anwesenheit des nachzuweisenden DNA/RNA-Templats. Unter den vielfältigen Reaktionstypen lassen sich insbesondere die Ligationsreaktionen gut in ein templatkontrolliertes Format implementieren. Aufgrund der im Vergleich zu den kurzen Reaktanden stark erhöhten Templataffinität der Verknüpfungsprodukte ist die Produktinhibierung hier jedoch besonders ausgeprägt. Dies hemmt die katalytische Aktivität des Templats und wirkt sich negativ auf das Detektionslimit aus. So liegen die für Verknüpfungsreaktionen berichteten Nachweisgrenzen bisher im piko- bis nanomolaren Bereich.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von geringsten Nukleinsäuremengen. Würde das während einer PCR gebildete Amplicon als Templat für eine nukleinsäuregesteuerte Ligationsreaktion fungieren, könnte die hohe Einzelbasenspezifität der templatgesteuerten Chemie mit der einer enzymatischen Amplifizierungsreaktion innewohnenden hohen Sensitivität verbunden werden. Die Herausforderung liegt dabei in den extremen Bedingungen während der PCR: Temperaturen bis zu 95 °C beschleunigen templat-unabhängige Prozesse wie etwa die Hydrolyse von elektrophilen Reaktanden und die Hintergrundreaktion. Darüber hinaus stellt die Anwesenheit von Enzymen (DNA-Polymerasen), Oligonukleotiden (Primern) und reaktiven Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) hohe Anforderungen an die Chemo Selektivität der Verknüpfungschemie. Außerdem muss die Reaktion sehr rasch ablaufen, da nur während der kurzen Primeranlagerungsphase ein teilweise einzelsträngiges Templat in einem Temperaturfenster vorliegt, welches der Affinität der reaktiven Sonden entspricht. Deren Hybridisierung muss dabei mit der Rehybridisierung des doppelsträngigen PCR-Produkts konkurrieren.

Unter den templatgesteuerten Ligationen zeichnet sich die native chemische Verknüpfung (NCL) von PNA-Thioestern und 1,2-aminothiolmodifizierten PNA-Konjugaten durch hohe Geschwindigkeiten und Einzelbasenspezifitäten aus.<sup>[65,171,173,175]</sup> Durch die auf dem NCL-Mechanismus basierende Verknüpfungschemie wird *per se* ein hohes Maß an Chemo Selektivität erreicht. Die Verwendung von PNA-basierten Reaktanden verhindert zudem deren enzymatische Prozessierung durch die DNA-Polymerase und bietet aufgrund der verbesserten Hybridisierungseigenschaften der PNA weitere Vorteile. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die native chemische PNA-Verknüpfung in eine PCR zu integrieren (Abbildung 13).



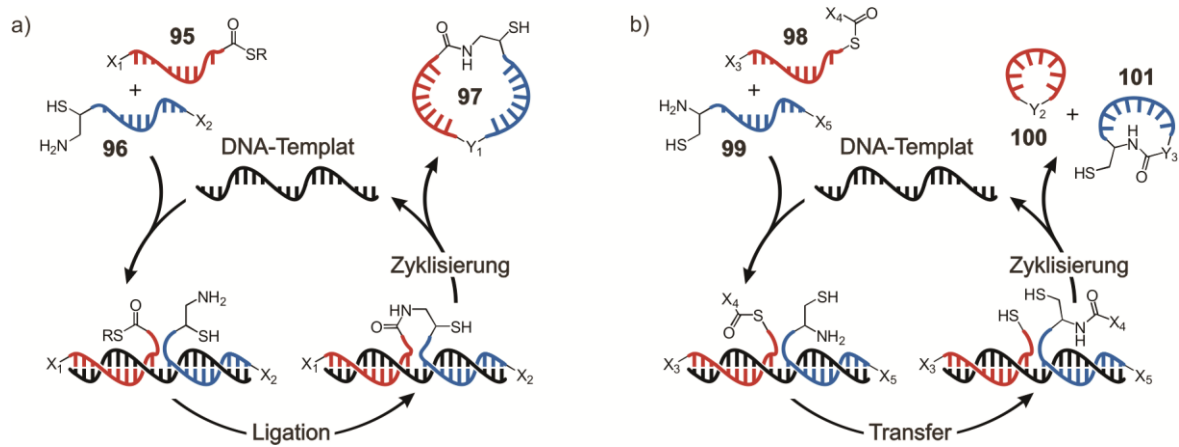
**Abbildung 13:** DNA-templatgesteuerte native chemische PNA-Verknüpfung während einer PCR (A = FRET-Akzeptor, D = FRET-Donor).

Die eingesetzten PNA-Konjugate **92** und **93** wurden dabei mit Fluorophoren markiert, um die Bildung des Verknüpfungsprodukts **94** mittels Fluorometrie in Echtzeit verfolgen zu können.

Das zuvor beschriebene Konzept soll die Empfindlichkeit von DNA-templatgesteuerten Verknüpfungsreaktionen durch die Kopplung mit einer enzymatischen Amplifizierung des Templats erhöhen. Ein alternativer Ansatz zur Sensitivitätssteigerung zielt auf eine Verminderung der Produktinhibierung ab. Bisherige Versuche erreichten eine Verringerung der Templataffinität des Verknüpfungsprodukts durch eine Erhöhung der Flexibilität an der Verknüpfungsstelle.<sup>[148,149,164,175]</sup> Die induzierte Störung des Produktduplexes ist dabei auf einen relativ kleinen Bereich beschränkt. Um eine umfassendere Störung herbeizuführen, wurden im zweiten Teil der Arbeit templatgesteuerte Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen entwickelt (Abbildung 14a). Die bis-funktionalisierten PNA-Konjugate **95** und **96** sollten zu den zyklischen Verknüpfungsprodukten **97** führen. Von diesen wurde vermutet, dass sie das Templat deutlich schwächer binden als ihre linearen Pendanten. Hierdurch wäre ihre Verdrängung vom Templat durch frische Reaktanden im Vergleich zu Ligrationsreaktionen ohne einen Zyklisierungsschritt erleichtert. Dies sollte eine Steigerung der katalytischen Templataktivität zur Folge haben. Schließlich wurde im dritten Teil der Arbeit untersucht, ob sich templatgesteuerte Zyklisierungen auch mit Transferreaktionen kombinieren lassen, die nicht zu einer Verknüpfung der Oligonukleotidsonden führen. Dies könnte ein Reaktionssystem hervorbringen, in dem die Produkte **100** und **101** sogar eine geringere Affinität zum Templat aufweisen als die Reaktanden **98** und **99** (Abbildung 14b).



### 3. Zielsetzung

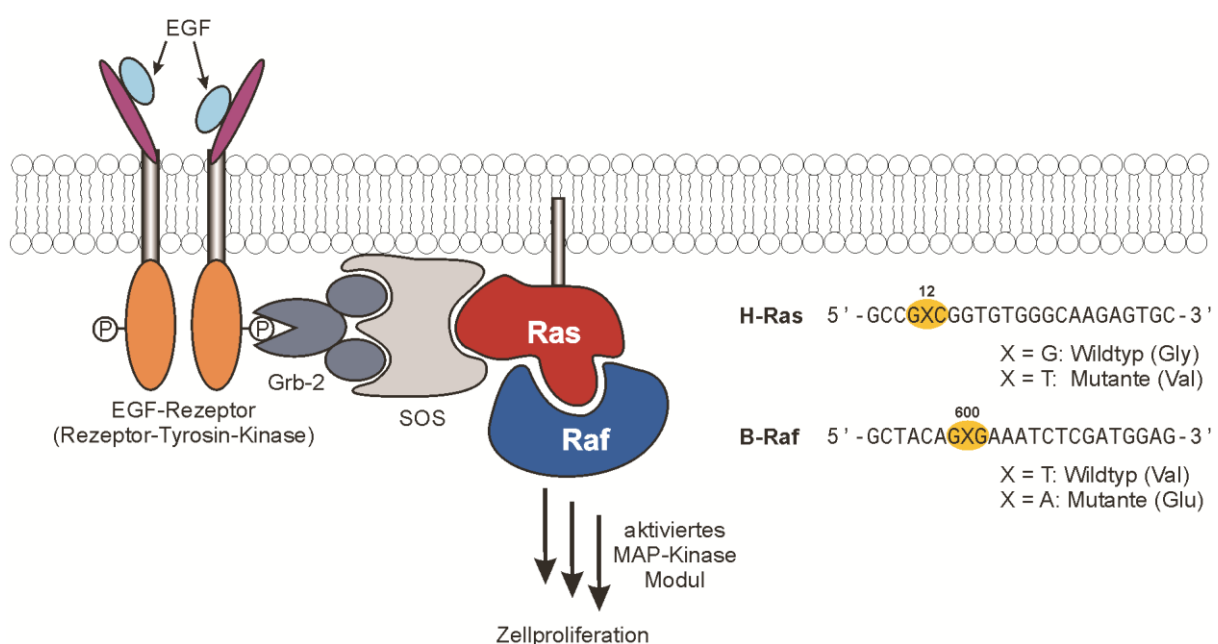


**Abbildung 14:** DNA-templatgesteuerte a) native chemische PNA-Verknüpfung mit anschließender Zyklisierung des Verknüpfungsprodukts und b) Transferreaktion mit anschließender Zyklisierung beider Reaktionsprodukte. Die für eine Zyklisierung benötigten funktionellen Gruppen  $\text{X}_1$ – $\text{X}_5$  bilden die entsprechenden Zyklisierungslinker  $\text{Y}_1$ – $\text{Y}_3$  aus.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Auswahl von relevanten Zielsequenzen

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, über den extrazelluläre Wachstumssignale in den Zellkern geleitet werden, ist der Pfad der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinase-Pfad). Zwei Schlüsselproteine dieses Pfads sind die GTPase Ras und die Proteinkinase Raf (Abbildung 15). Durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor wird über eine Reaktionskaskade das membranständige Ras-Protein aktiviert, welches daraufhin das im Zytosol vorliegende Raf-Protein rekrutiert. Raf leitet nun eine Phosphorylierungskaskade ein, die zur Aktivierung nachgeschalteter Proteinkinasen und schließlich von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führt. Diese vermitteln letztendlich die zelluläre Antwort auf das ursprüngliche Wachstumssignal. Die Gene für das Ras- und das Raf-Protein sind sogenannte proto-Onkogene, da Mutationen innerhalb ihrer Sequenz häufig in entarteten Krebszellen auftreten.<sup>[230–242]</sup> So werden in 20–30% aller menschlichen Tumore Mutationen des Ras-Gens gefunden.<sup>[231]</sup> Beispielsweise ist der Austausch eines Guanins durch ein Thymin im zwölften Codon des Gens für die H-Ras-Isoform eine häufig vorkommende, karzinogene Einzelbasenmutation.<sup>[232]</sup> Die dadurch induzierte Substitution eines Glycins durch ein Valin im zugehörigen Protein (G12V-Mutation) verursacht eine permanente Aktivierung des Ras-Proteins und kann eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge haben; ein typisches



**Abbildung 15:** MAP-Kinase-Signaltransduktionspfad am Beispiel des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF).

Charakteristikum von bösartigen Tumoren. Auch das Raf-Protein wird durch bestimmte Aminosäuresubstitutionen in einen Zustand der permanenten Aktivierung versetzt. So kommt der Austausch eines Thymins gegen ein Adenin im Codon für die 600. Aminosäure (T1799A bzw. V600E-Mutation) im Gen der B-Raf-Isoform besonders häufig in Melanomen,<sup>[233–240]</sup> aber auch in Schilddrüsenkarzinomen vor.<sup>[241,242]</sup> Die onkogenen Formen der H-Ras- und B-Raf-Gene stellen somit relevante Zielsequenzen für eine templatgesteuerte, einzelbasenspezifische Nachweisreaktion dar.

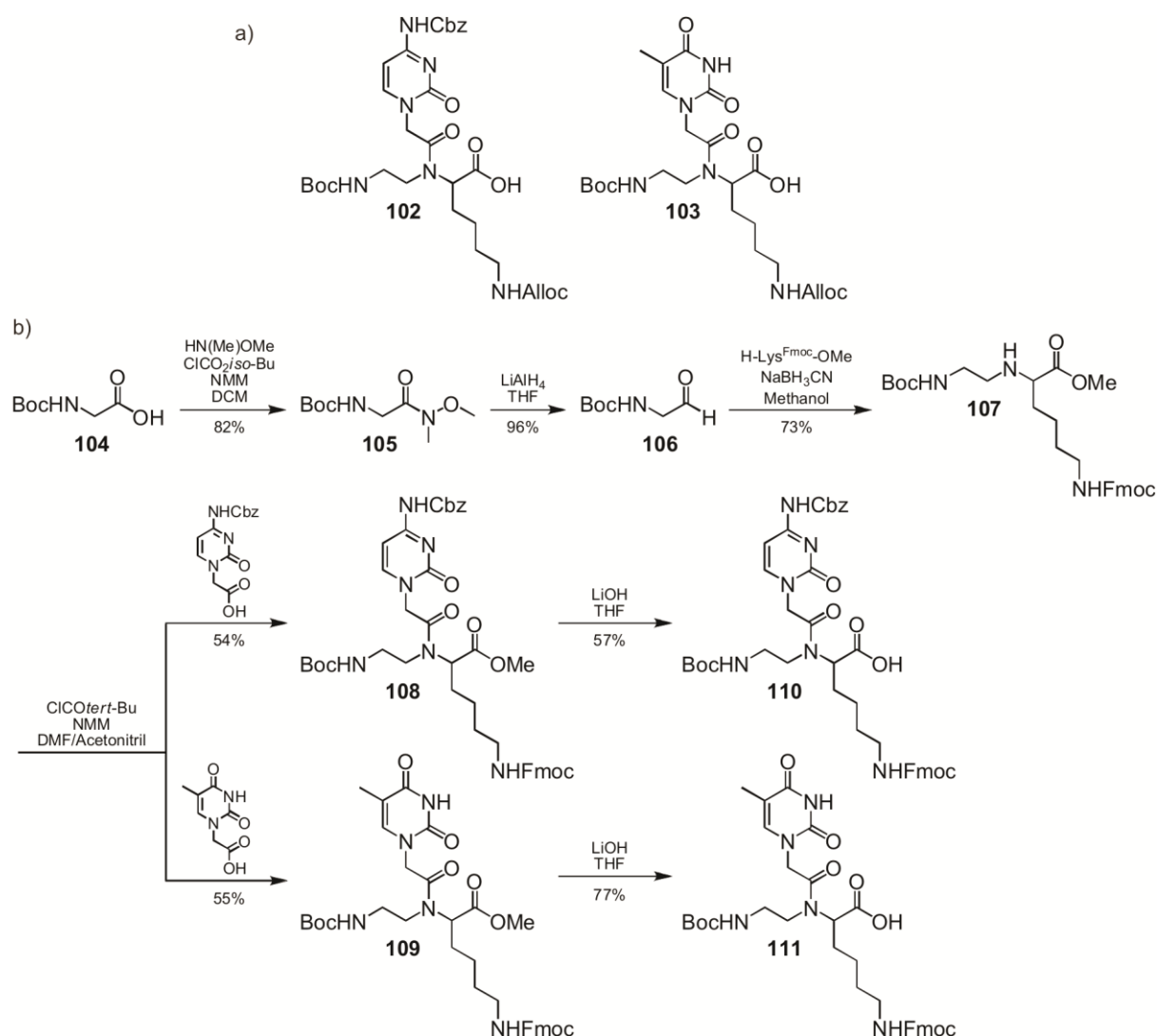
### 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR

Im ersten Teil der Arbeit war es das Ziel, eine fluorogene native chemische PNA-Verknüpfungsreaktion zu entwickeln, die während der PCR abläuft und durch das amplifizierte Templat gesteuert wird. Der Fortschritt der Reaktion sollte dabei im Sinne einer *real-time* PCR in Echtzeit verfolgt werden können. Dies erforderte zunächst die Synthese von donor- und akzeptorfluorophormarkierten PNA-Sonden. Durch die Nähe beider Fluorophore im Verknüpfungsprodukt kann ein FRET induziert werden. Dieser bewirkt, dass die Donorfluoreszenz zu- und die Akzeptoremision abnimmt, wenn der Donorfluorophor angeregt wird. Die Bedingungen während der PCR setzten eine gewisse Länge der verwendeten PNA-Oligomere voraus, um auch bei höheren Temperaturen eine ausreichende Affinität für das DNA-Templat zu gewährleisten. Die oftmals durchgeführte terminale Farbstoffmarkierung würde bei längeren Sonden zu einem sehr großen Abstand der Fluorophore im Reaktionsprodukt führen. Dies hätte eine geringe FRET-Effizienz zur Folge, da diese von der sechsten Potenz des Abstands der Partner abhängt.<sup>[83]</sup> Außerdem wird sie von der Orientierung der Übergangsdipolmomente beeinflusst, sodass eine Optimierung der internen Anbindungsstellen nötig ist. Für eine sequenzinterne Anbringung der Farbstoffmoleküle wurden daher PNA-Monomere mit einem *N*-(2-Aminoethyl)-Lysin-Rückgrat synthetisiert. Deren Seitenkettenfunktionalität gestattet die Kupplung der FRET-Partner 6-Carboxyfluorescein (FAM) und 6-Tetramethylrhodamin (TMR) über Amidbindungen.

#### 4.2.1 Synthese von modifizierten, orthogonal geschützten PNA-Monomeren

Die Markierung der Sonden mit den Fluorophoren sollte während der Festphasensynthese gelingen, da dies den synthetischen Aufwand minimiert. Daher mussten die Schutzgruppen an den Lysinseitenketten der modifizierten PNA-Monomere orthogonal zu den in der Festphasensynthese eingesetzten Schutzgruppen sein. Der sequenzielle Aufbau der für die

native chemische PNA-Verknüpfung benötigten Thioester erfolgt bevorzugt über die Boc/Cbz-Schutzgruppenstrategie, da die basischen Abspaltbedingungen in der alternativen Fmoc-Strategie zur Aminolyse der Thioester führen würden. Daher wurden bereits während der Diplomarbeit<sup>[243]</sup> das Boc/Cbz-geschützte PNA-Cytosinmonomer **102**<sup>[65]</sup> und das Boc-geschützte PNA-Thyminmonomer **103** hergestellt, deren Lysinrückgrate mit der Alloc-Schutzgruppe versehen waren (Abbildung 16a). Die Alloc-Gruppe ist stabil gegenüber der in der Boc-Strategie eingesetzten Trifluoressigsäure (TFA) und lässt sich nach dem Aufbau der PNA-Sequenz durch  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in Gegenwart eines nukleophilen Allylfängers abspalten. Während dies bei den PNA-Thioestern gelang, erwiesen sich die Abspaltbedingungen bei den (Iso)cysteinyln-PNAs, die mit den gleichen Monomerbausteinen aufgebaut wurden, als problematisch. So bildete die terminale 1,2-Aminothioleinheit wahrscheinlich unter



**Abbildung 16:** a) Rückgratmodifiziertes PNA-Cytosinmonomer **102** und PNA-Thyminmonomer **103** mit Alloc-geschützten Seitenkettenaminogruppen. b) Synthese der entsprechenden PNA-Monomere **110** und **111** mit Fmoc-geschützter Seitenkette.

Mitwirkung eines dritten Liganden aus der PNA-Sequenz mit dem eingesetzten Palladium einen Chelatkomplexe aus, der sich nicht durch Säuren oder Basen zerstören ließ.<sup>[243]</sup> Um dieses Problem zu umgehen, bot sich der Austausch der Alloc-Schutzgruppe durch die Fmoc-Gruppe an. Die zur Fmoc-Abspaltung benötigten basischen Bedingungen stellen für die Aminothiol-PNAs keine Gefahr dar. Außerdem ist die Abspaltung wesentlich schneller und praktikabler, da nicht unter Ausschluss von Sauerstoff gearbeitet werden muss. Daher wurde eine Synthese für neue, an der Seitenkette des Rückgrats mit der Fmoc-Gruppe geschützte PNA-Cytosin- und PNA-Thyminmonomere **110** und **111** erarbeitet (Abbildung 16b).

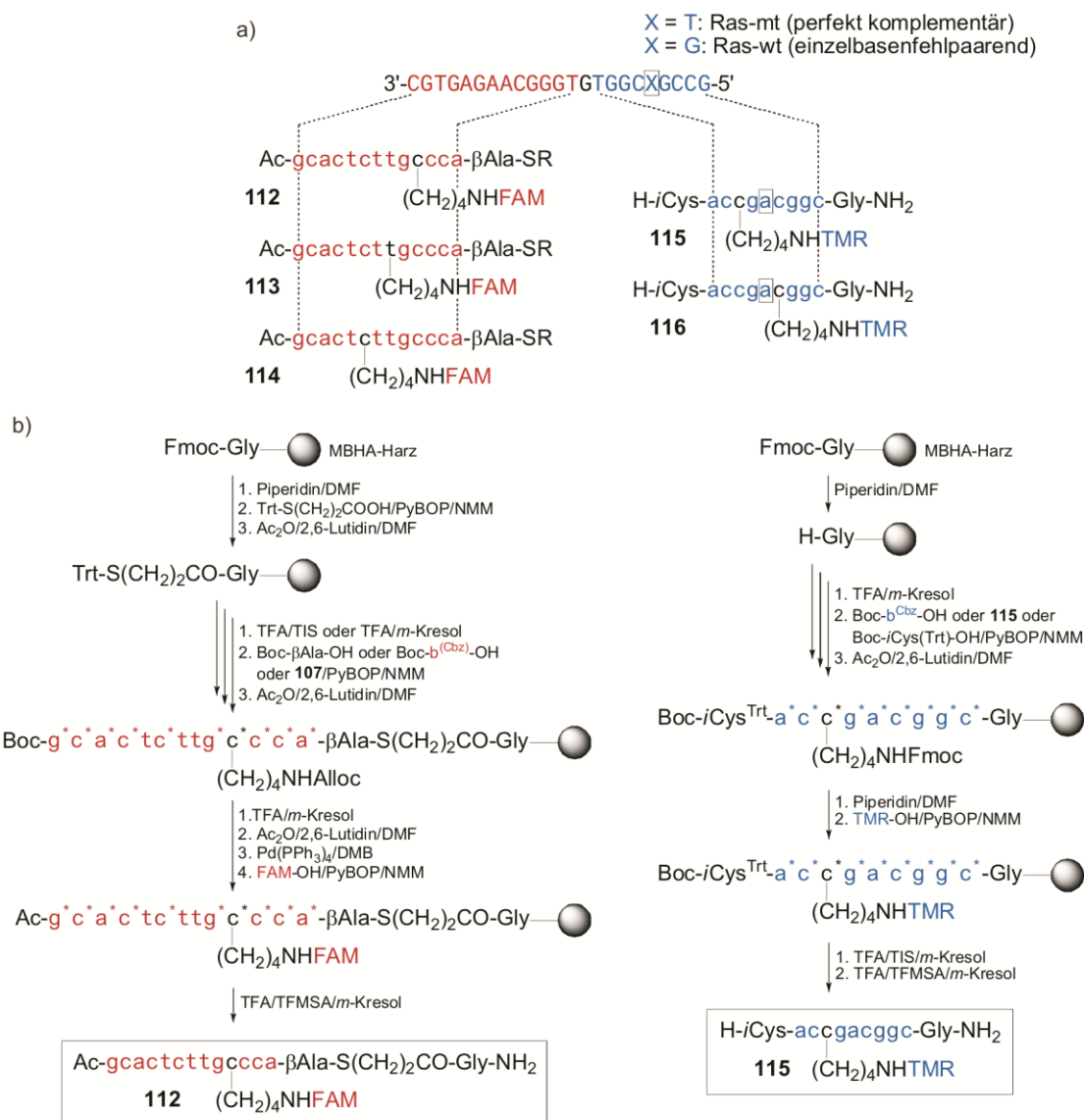
*N*-Boc-Glycin **104** wurde in Gegenwart von Isobutylchlorformiat, *N*-Methylmorpholin (NMM) und *N,O*-Dimethylhydroxylamin in das entsprechende „Weinrebamid“ **105** umgewandelt. Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid ergab den *N*-Boc-Glycinaldehyd **106** in einer Rohausbeute von 96%, was eine beträchtliche Steigerung zu vergangenen Versuchen (max. 33%)<sup>[243]</sup> darstellte. Das Waschen des Rohprodukts mit 0.1 M HCl wurde durch Waschen mit weniger saurer Kaliumhydrogensulfatlösung ersetzt, was die zuvor beobachtete Zersetzung des Aldehyds verhinderte. Auf eine Säulenchromatografie wurde verzichtet, da diese zur Acetalbildung mit den Silanolgruppen des Kieselgels führen kann. Nach reduktiver Aminierung mit *N*<sup>ε</sup>-Fmoc-Lysinmethylester konnte das PNA-Rückgrat **107** mit 73% Ausbeute isoliert werden. Auf dessen sekundäre Aminogruppe wurde anschließend die über ein gemischtes Anhydrid aktivierte *N*<sup>δ</sup>-Cbz-Cytosin- oder Thymin-1-yl-essigsäure gekuppelt. Die mit einer Ausbeute von 54–55% erhaltenen Methylester **108** und **109** konnten durch Verseifung mit Lithiumhydroxid in die freien Säuren **110** und **111** überführt werden. Die für eine basische Esterspaltung mit 57% bzw. 77% relativ niedrigen Ausbeuten resultierten aus dem partiellen Verlust der Fmoc-Schutzgruppe, welcher jedoch zu Gunsten der vollständigen Verseifung in Kauf genommen wurde. Beide Monomere konnten in Gesamtausbeuten von 18% (**110**) bzw. 24% (**111**) bezüglich des Ausgangsstoffs *N*-Boc-Glycin erhalten werden.

### 4.2.2 Synthese von PNA-Konjugaten für die fluorogene PNA-Verknüpfung

Die ersten Versuche zur templatvermittelten PNA-Verknüpfung zielten auf die Detektion der G12V-Einzelbasenmutation des humanen H-Ras-Gens ab. Es war geplant, die templatgesteuerte PNA-Verknüpfung vor einem möglichen Einsatz in der PCR zuerst an kurzen, einzelsträngigen Templaten zu testen. In vorangegangenen Arbeiten zur DNA-kontrollierten PNA-Verknüpfung wurde das entsprechende H-Ras-Segment des Wildschweins als Templat

## 4. Ergebnisse und Diskussion

verwendet.<sup>[65,171,173,175]</sup> Hierbei erwies sich eine Hybridisierung der PNA-Sonden unter Ausbildung einer ungepaarten Templatbase als vorteilhaft für eine hohe Einzelbasenspezifität.<sup>[171]</sup> Daher wurde dieser Aufbau bei der Wahl der PNA-Sonden zur Detektion des menschlichen H-Ras-Gensegments beibehalten. Die Stelle des potentiellen G→T-Austauschs befindet sich im ternären Sonden-Templat-Komplex gegenüber den TMR-markierten 1,2-Aminothioli-PNAs (Abbildung 17a). Diese bilden mit der Wildtypvariante Ras-wt eine Einzelbasenfehlpaarung aus, während sie zur Mutante Ras-mt perfekt komplementär sind.



**Abbildung 17:** a) Die FAM-markierten PNA-βAla-Thioester **112–114** hybridisieren am Ras-Templat unter Ausbildung einer ungepaarten Templatbase neben den TMR-markierten iCys-PNAs **115** und **116** (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub>). b) Syntheschema für die fluorophormarkierten PNA-Thioester und iCys-PNAs am Beispiel der Konjugate **112** und **115**. Die exozyklischen Aminogruppen der mit \* gekennzeichneten Nukleobasen tragen Cbz-Schutzgruppen.

Die Synthese der FAM-markierten PNA- $\beta$ Alanylthioester **112–114** unter Verwendung der Alloc-geschützten PNA-Monomere **102** und **103** wurde schon in der Diplomarbeit beschrieben.<sup>[243]</sup> Die Entscheidung für PNA- $\beta$ Alanylfragmente als Acylkomponenten der Thioester beruhte auf zuvor gewonnenen Erkenntnissen von Grossmann.<sup>[244]</sup> PNA- $\beta$ Alanylthioester zeichneten sich im Vergleich zu PNA-Glycylthioestern durch niedrigere Hintergrundraten und höhere Einzelbasenspezifitäten aus. Dies kann durch die geringere Reaktivität der Thioester begründet werden, die von dem um eine Methyleinheit vergrößerten Abstand zwischen dem elektronenziehenden PNA-Acylrest und dem elektrophilen Thioesterkohlenstoff herrührt. Verlangsamte Verknüpfungen in Abwesenheit von DNA-Templaten wurden auch beobachtet, wenn Isocystein an Stelle von Cystein als Aminothiolkomponente Verwendung fand.<sup>[175]</sup> Daher wurden die nukleophilen PNA-Sonden **115** und **116** als Isocysteiny-PNAs synthetisiert (Abbildung 17b). Mit Fmoc-Glycin-OH beladenes, 4-methylbenzhydrylaminfunktionalisiertes Harz (MBHA-Harz) diente dabei als Startmaterial. Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte der Aufbau der PNA-Sequenz. Dazu wurde das gewünschte PNA-Monomer mit dem Kupplungsreagenz PyBOP und NMM aktiviert und auf die terminale Aminofunktion der harzgebundenen Spezies gekuppelt. Nicht umgesetzte Aminogruppen wurden durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid/2,6-Lutidin/*N,N*-Dimethylformamid (DMF) acetyliert, um die Entstehung von Deletionssequenzen zu verhindern. Die anschließende Abspaltung der terminalen Boc-Schutzgruppe durch TFA/*m*-Kresol erzeugte wieder ein für die Kupplung des nächsten Monomers benötigtes, freies Amin. Nach der finalen Umsetzung mit Boc-*i*Cys<sup>T<sub>rt</sub></sup>-OH wurde die Seitenkette des integrierten PNA-Monomers **110** durch Piperidin/DMF deblockiert und an dieser der Akzeptorfluorophor TMR installiert. Nach der durch TFA/Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) vermittelten Freisetzung von der festen Phase konnten die Isocysteiny-PNAs **115** und **116** nach HPLC-Reinigung mit 10% bzw. 12% Ausbeute isoliert werden.

Um den Einfluss der Fluorophoranbindungsstellen auf den FRET zu untersuchen, wurden verschiedene Paare der reaktiven PNA-Konjugate in Lösung bei Konzentrationen von 100  $\mu$ M zu den Verknüpfungsprodukten **117–122** umgesetzt. Diese unterscheiden sich nur in dem Abstand der Fluorophore ( $\Delta N$ ), der 7 bis 14 PNA-Monomereinheiten beträgt, wenn das interne Dipeptid ( $\beta$ Ala-*i*Cys) als ein PNA-Monomer gezählt wird (Abbildung 18). Während der Synthese offenbarte sich die geringe Wasserlöslichkeit der TMR-markierten Isocysteiny-PNAs im neutralen pH-Bereich, von denen bei Zugabe zum Reaktionspuffer ein erheblicher Teil präzipitierte. Löslichkeitsversuche ergaben, dass die Sonden nur im stark sauren Milieu

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Reaktanden	Verknüpfungsprodukt	Fluorophorabstand ( $\Delta N$ ) in PNA-Monomereinheiten
112 + 115	Ac-gcactcttgcca- $\beta$ Ala- <i>i</i> Cys-accgacggc-Gly-NH <sub>2</sub> 117 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHFAM (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHTMR	7
113 + 115	Ac-gcactcttgcca- $\beta$ Ala- <i>i</i> Cys-accgacggc-Gly-NH <sub>2</sub> 118 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHFAM (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHTMR	9
112 + 116	Ac-gcactcttgcca- $\beta$ Ala- <i>i</i> Cys-accgacggc-Gly-NH <sub>2</sub> 119 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHFAM (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHTMR	10
114 + 115	Ac-gcactcttgcca- $\beta$ Ala- <i>i</i> Cys-accgacggc-Gly-NH <sub>2</sub> 120 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHFAM (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHTMR	11
113 + 116	Ac-gcactcttgcca- $\beta$ Ala- <i>i</i> Cys-accgacggc-Gly-NH <sub>2</sub> 121 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHFAM (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHTMR	12
114 + 116	Ac-gcactcttgcca- $\beta$ Ala- <i>i</i> Cys-accgacggc-Gly-NH <sub>2</sub> 122 (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHFAM (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHTMR	14

**Abbildung 18:** Verknüpfungsprodukte **117–122** mit zugehörigem Fluorophorabstand  $\Delta N$ .

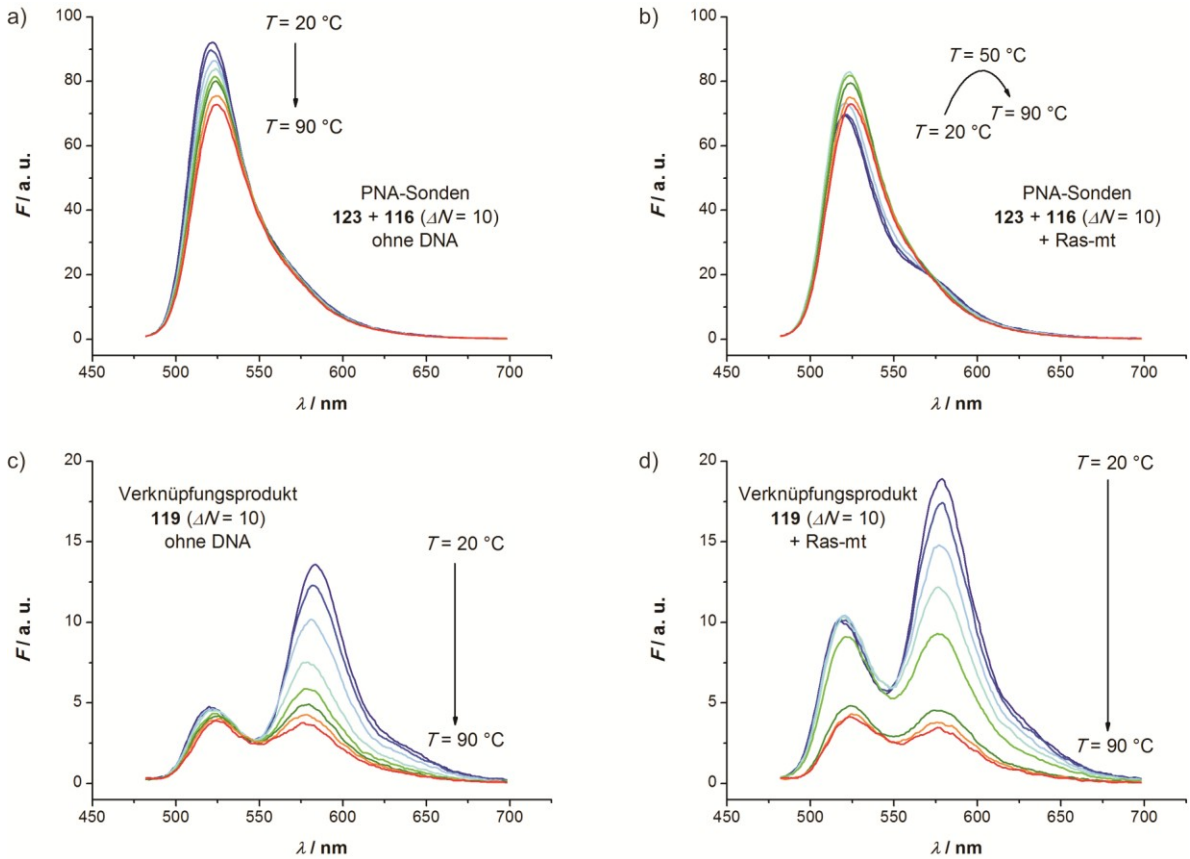
vollständig gelöst blieben. Da eine Erniedrigung des pH-Werts aufgrund des Reaktionsmechanismus der NCL keine Option darstellte, wurden dem Puffer 30% DMF und 20% Acetonitril zugesetzt. Obwohl dies nicht genügte, um die Thiole vollständig in Lösung zu bringen, konnten die Verknüpfungsprodukte nach 2–3 Tagen Reaktionszeit und chromatografischer Reinigung mit Ausbeuten von 18–35% isoliert werden.

### 4.2.3 Optimierung des Fluorophorabstands im Verknüpfungsprodukt

Mit den drei FAM-markierten PNA-Thioestern **112–114**, den zwei TMR-markierten Isocysteiny-PNAs **115** und **116** sowie den sechs Verknüpfungsprodukten **117–122** standen alle Verbindungen für eine Untersuchung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Fluorophorabstand zur Verfügung. Dazu wurden Fluoreszenzspektren der Sondenpaare sowie der Verknüpfungsprodukte in Abwesenheit und in Gegenwart des komplementären Templates Ras-mt aufgenommen. Die Anregung des Donorfluorophors FAM erfolgte neben dem Absorptionsmaximum ( $\lambda_{max.} = 495$  nm) bei 470 nm, um eine direkte Anregung des Akzeptorfluorophors TMR zu minimieren. Die Fluoreszenz wurde über einen Wellenlängenbereich von 480–700 nm bei Temperaturen von 20–90 °C ausgelesen. Um eine templatvermittelte Verknüpfung der Sonden während der Fluoreszenzmessungen zu verhindern, wurden die Thioester **112–114** vorher mit NaOH in die freien Säuren **123–125** überführt.



## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR

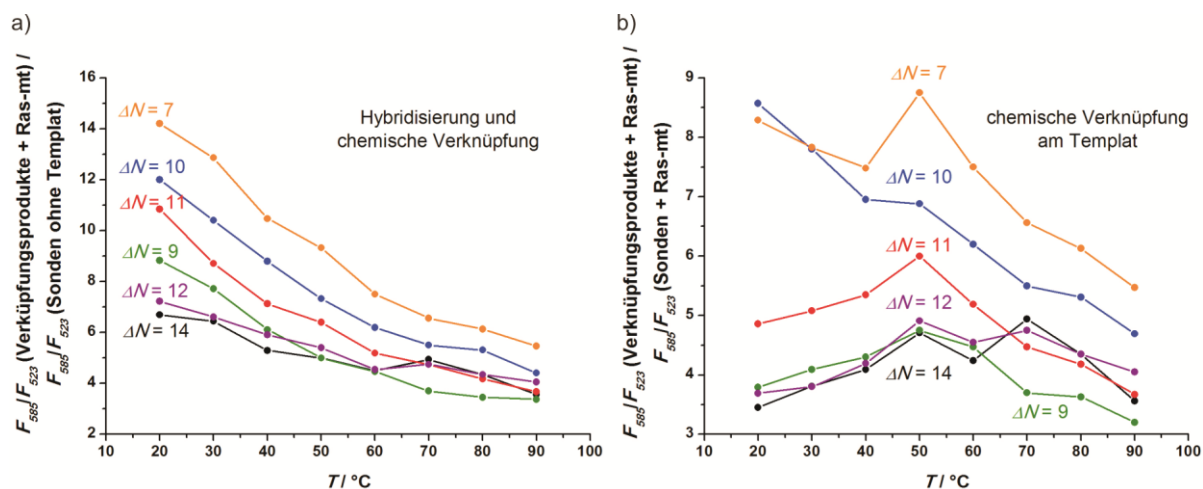


**Abbildung 19:** Fluoreszenzspektren des a), b) Sondenpaars **123 + 116** ( $\Delta N = 10$ ) und des c), d) Verknüpfungsprodukts **119** ( $\Delta N = 10$ ) in a), c) Abwesenheit und b), d) Gegenwart des komplementären DNA-Templats Ras-mt (100 nM Sonden, Verknüpfungsprodukt und ggf. DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 20\text{--}90^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex.}} = 470\text{ nm}$ ).

Die Fluoreszenzspektren der Sondenpaare in Abwesenheit des Templats zeigten eine intensive FAM-Emission bei 523 nm, wie am Beispiel des Paares **123 + 116** ( $\Delta N = 10$ ) deutlich wird (Abbildung 19a). Die FAM-Fluoreszenz nahm mit steigender Temperatur leicht ab. Nach Zugabe der komplementären DNA Ras-mt konnte eine Veränderung der Spektren beobachtet werden (Abbildung 19b). Nun durchlief die FAM-Emission bei  $50^\circ\text{C}$  ein Maximum und war bei dieser und bei höheren Temperaturen genauso groß wie in Abwesenheit von DNA. Bei  $T < 50^\circ\text{C}$  nahm sie wieder ab, was durch eine leichte Zunahme der TMR-Emission bei 585 nm begleitet wurde. Diese Phänomene können wie folgt erklärt werden: Im Bereich von  $90\text{--}50^\circ\text{C}$  nimmt die Stoßdeaktivierung mit kleiner werdender Temperatur ab, was zu einer leichten Erhöhung der FAM-Emission führt. Bei weiterer Verminderung der Temperatur liegen in Gegenwart des Templats immer mehr Sondenpaare in ternären Komplexen vor, wodurch ein schwacher FRET zwischen FAM und TMR induziert wird. Dieser führt wieder zu einer Verringerung der FAM- und einer Erhöhung der TMR-Fluoreszenz.

Die Fluoreszenzspektren der Verknüpfungsprodukte **117–122** in Abwesenheit des Templats belegten in allen Fällen einen stark ausgeprägten Energietransfer, wie am Beispiel von Verbindung **119** ( $\Delta N = 10$ ) demonstriert ist (Abbildung 19c). Dieser zeichnete sich durch eine Donorfluoreszenz aus, welche bei niedrigen Temperaturen die Akzeptoremission überstieg. Die FAM-Fluoreszenz nahm auch hier mit zunehmender Temperatur leicht ab, wohingegen der TMR-Fluorophor eine wesentlich stärkere Löschung erfuhr. Nach Zugabe des DNA-Templats Ras-mt kam es von 20–60 °C zu einer Verstärkung beider Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 19d). Bei diesen Temperaturen kann von einer Duplexbildung mit dem Templat ausgegangen werden, die eine Fluoreszenzlöschung durch Stoßdeaktivierung in geknäulten Einzelstrangstrukturen teilweise aufhebt.

Entscheidend für einen hohen Signalanstieg in späteren templatgesteuerten Ligationsreaktionen ist eine möglichst große Änderung des Verhältnisses aus Akzeptor- und Donorfluoreszenzintensität ( $F_{585}/F_{523}$ ) im Zuge der chemischen Verknüpfung. Deshalb wurde der entsprechende Quotient des Verknüpfungsprodukts in Gegenwart des Templats durch den Wert der Sonden in Abwesenheit der DNA dividiert und über der Temperatur aufgetragen (Abbildung 20a). Hervorzuheben sind die Werte bei 50 °C, denn dies ist die niedrigste Temperatur, die bei einer gewöhnlichen PCR in der Primeranlagerungsphase erreicht wird. Die durch die Zugabe des Templats mit anschließender quantitativer Verknüpfung der Sonden theoretisch erzielbaren Signalanstiege lagen hier im Bereich von 5–10-fach, wobei die besten Steigerungen für die Kombinationen mit  $\Delta N = 7$ , 10 und 11 erzielt wurden. Die drei zugehörigen Sondenpaare wurden daher für die folgende Untersuchungen ausgewählt. Aus



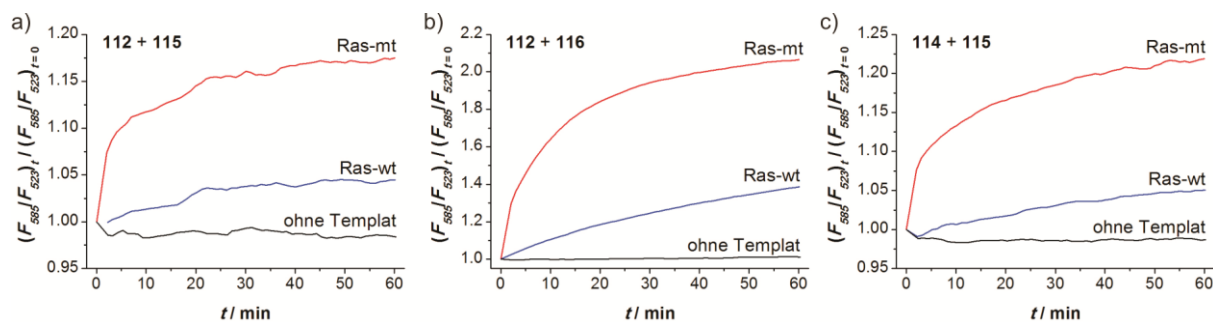
**Abbildung 20:** Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 585 nm und 523 nm ( $F_{585}/F_{523}$ ) der Verknüpfungsprodukte in Gegenwart und der Sondenpaare in a) Abwesenheit und in b) Gegenwart des komplementären Templats Ras-mt in Abhängigkeit von  $T$ .

den gesammelten Daten lässt sich noch ein zweiter interessanter Wert ableiten. Dividiert man das Fluoreszenzintensitätenverhältnis der Verknüpfungsprodukte durch das der Sonden in Gegenwart des Templats, erhält man den Teil des Signalanstiegs, der nur durch die chemische Verknüpfung der benachbart hybridisierten Sonden verursacht wird (Abbildung 20b). Dies gilt jedoch nur bei niedrigen Temperaturen, bei denen keine großen Unterschiede im Hybridisierungsverhalten der kurzen Sonden und langen Verknüpfungsprodukte zu erwarten sind. Mit Werten von 3.5–8.5 ist dieser Anteil recht hoch und spiegelt den nur schwach ausgeprägten FRET zwischen den nicht verknüpften Sonden im ternären Komplex mit dem Templat wider. Die Umwandlung des Eduktkomplexes zum Produktduplex führt demnach zu konformativen Änderungen, die für einen effizienten FRET von Vorteil sind.

### 4.2.4 Templatgesteuerte chemische PNA-Verknüpfung am H-Ras-Templat

Die Sondenpaare **112 + 115** ( $\Delta N = 7$ ), **112 + 116** ( $\Delta N = 10$ ) und **114 + 115** ( $\Delta N = 11$ ) wurden anschließend in templatgesteuerten Reaktionen mit dem perfekt komplementären DNA-Templat Ras-mt umgesetzt. Zur Bestimmung der Einzelbasenspezifität und der Hintergrundrate wurden zusätzlich Reaktionen mit dem einzelbasenfehlpaarenden Templat Ras-wt sowie in Abwesenheit eines Templats angesetzt. Vor jeder Reaktion erfolgte eine Umwandlung der PNA-Mercaptopropionsäurethioester in die reaktiveren 2-Mercaptoethansulfonsäure-Thioester (MESNA-Thioester) durch dreistündiges Schütteln im Reaktionspuffer, dem 10 mM Natrium-2-mercaptoethansulfonat (MESNa) zugesetzt waren. MESNa diente ebenfalls als Reduktionsmittel, um eventuell gebildete Disulfide der Isocysteinyln-PNAs zu reduzieren. Daher wurden diese vor Beginn der Reaktion ebenfalls für 1 h getrennt von den Thioestern im Reaktionspuffer inkubiert. Die Umsetzungen fanden bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M und einer Temperatur von 50 °C statt und wurden am Fluoreszenzspektrometer zeitabhängig verfolgt. Dazu wurde der FAM-Fluorophor bei 470 nm angeregt und die Emissionen bei 523 nm ( $F_{523}$ , FAM) und 585 nm ( $F_{585}$ , TMR) ausgelesen. Der berechnete Quotient  $(F_{585}/F_{523})_t / (F_{585}/F_{523})_{t=0}$  (im Folgenden als FRET-Signal bezeichnet) stellt über die Zeit aufgetragen ein Maß für das Fortschreiten der Reaktionen dar. Während das FRET-Signal in Abwesenheit von DNA für alle Sondenpaare annähernd konstant blieb, stieg es in Gegenwart des komplementären Templats Ras-mt bei der Umsetzung von **112** mit **116** nach 1 h auf einen Wert von 2.1 an. Dies war unter allen getesteten Verknüpfungsreaktionen der mit Abstand größte Anstieg (Abbildung 21). Aus dem Verhältnis der durch Ras-mt und Ras-wt verursachten Signalanstiege im linearen Anfangsstadium der Reaktionen ergab sich eine Einzelbasenspezifität von  $S = 10$ . Allerdings war die Anfangsrate des Signalanstiegs für die

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



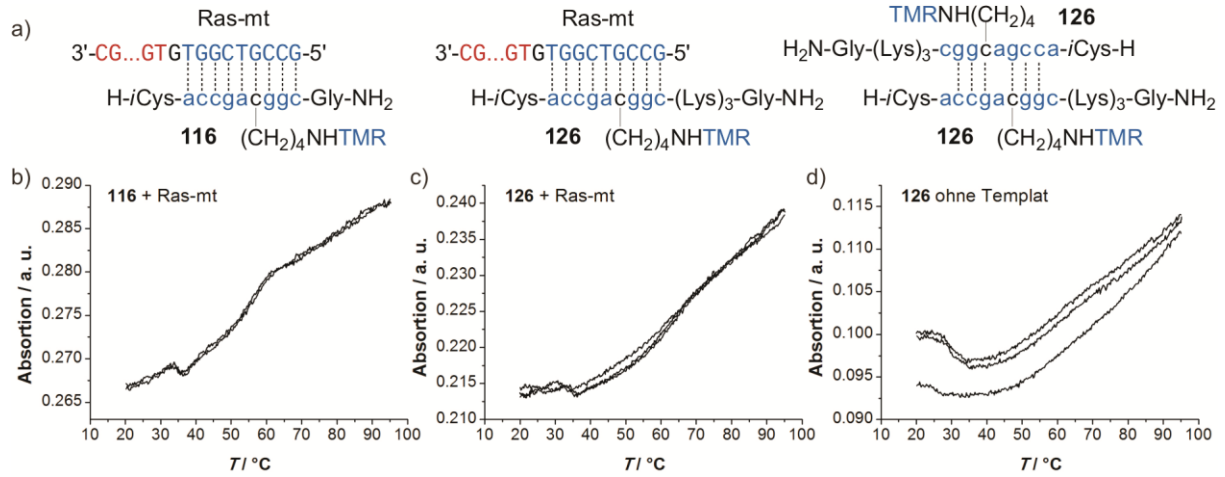
**Abbildung 21:** Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung der PNA-Thioester **112** oder **114** mit den *i*Cys-PNAs **115** oder **116** (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 50^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex.}} = 470\text{ nm}$ ).

durch Ras-mt beschleunigte Reaktion von **112** und **116** mit  $0.11\text{ min}^{-1}$  recht klein. Da während der Anlagerungsschritte einer PCR nur sehr wenig Zeit für eine Reaktion zur Verfügung steht, sollten möglichst hohe Anfangsraten erzielt werden.

Ein anderes Problem stellte die auch bei niedrigen Konzentrationen von 1  $\mu$ M weiterhin geringe Löslichkeit der TMR-markierten Isocysteiny-PNAs dar. Eine Analyse der PNA-Sequenz ergab ein hohes Maß an Selbstkomplementarität, die durch sechs GC-Basenpaare hervorgerufen wird. Zusätzlich existieren vermutlich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Systemen der TMR-Fluorophore sowie den Nukleobasen. Da solche homogenen Duplexe als Keime für höhermolekulare Aggregate wirken können, würde auf diese Weise eine Aggregation der PNAs begünstigt. Wahrscheinlich liegt darin auch der Grund für die sehr unterschiedlichen Signalanstiege der templatgesteuerten Verknüpfungen. Offensichtlich liefern beide Reaktionen, in denen Isocysteiny-PNA **115** involviert ist, deutlich kleinere Anstiege. Es ist möglich, dass die Anbindungsstelle des Fluorophors in **115** zu günstigeren hydrophoben Wechselwirkungen der Farbstoffe als in **116** führt und daher eine verstärkte Aggregation hervorruft. Somit stünde für eine Reaktion weniger gelöstes **115** zur Verfügung.

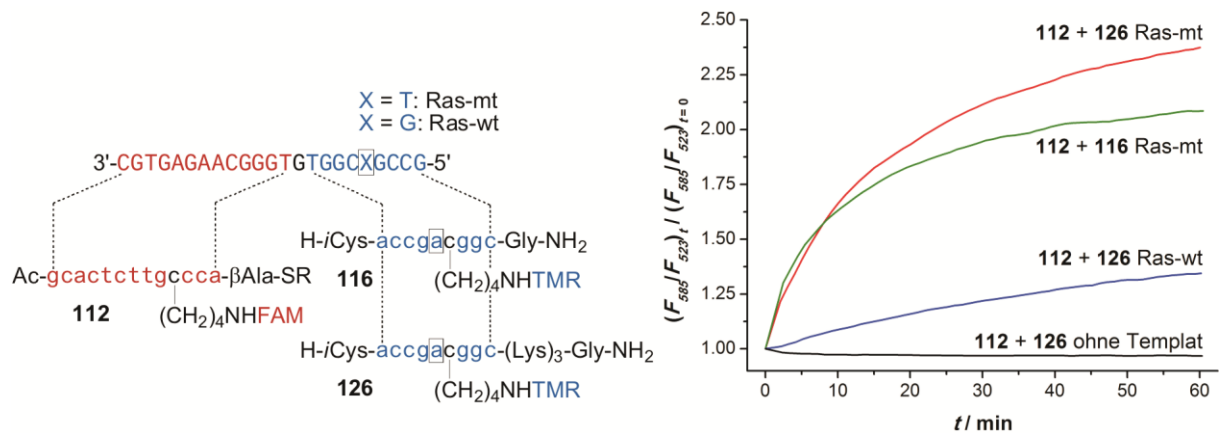
Die Einführung von positiv geladenen Gruppen könnte die Aggregation der Isocysteiny-PNAs über elektrostatische Abstoßung und eine Erhöhung der Hydrophilie zurückdrängen. Daher wurde die am C-Terminus mit drei Lysinen versehene Isocysteiny-PNA **126** synthetisiert (Abbildung 22a). Die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste liegen im neutralen pH-Bereich protoniert vor ( $\text{pK}_s > 10$ ). Die aus Denaturierungsexperimenten von **116** und **126** mit dem komplementären Templat Ras-mt erhaltenen Schmelzkurven ergaben jedoch in beiden Fällen keinen sigmoidalen Verlauf, wie für die reversible Bildung einer Duplexstruktur zu

## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 22:** a) Schematische Darstellung der PNA-DNA-Duplexe aus der Sonde **116** bzw. aus der mit Lysinen modifizierten Sonde **126** und Ras-mt, sowie eines aus **126** gebildeten PNA-PNA-Duplexes. b)–d) Schmelzkurven der TMR-markierten iCys-PNA-Konjugate **116** und **126** mit dem komplementären Templat Ras-mt sowie ohne Templat (500 nM Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM TRIS, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 8.0,  $\lambda = 260$  nm, Dreifachmessungen).

erwarten wäre (Abbildung 22b, c). Ein Kontrollexperiment, bei dem **126** ohne das Templat untersucht wurde, lieferte einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 22d). Die templat-vermittelte Umsetzung von **126** mit dem PNA-Thioester **112** ergab nur eine leichte Verbesserung des Signalanstiegs (Abbildung 23). Dieser kam jedoch in dem für eine Anwendung in der PCR wichtigen Anfangsstadium der Reaktion nicht zum Tragen. Die Einzelbasenspezifität war mit  $S = 10$  genauso groß wie für die Umsetzung von **112** mit **116**. Zusammenfassend lässt sich aus den experimentellen Daten schließen, dass die Einführung der Lysinreste nur zu einer moderaten Solubilisierung der Isocysteiny-PNA-Konjugate



**Abbildung 23:** Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung des PNA-Thioesters **112** mit den iCys-PNAs **116** oder **126** (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 50$  °C,  $\lambda_{ex} = 470$  nm, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H).

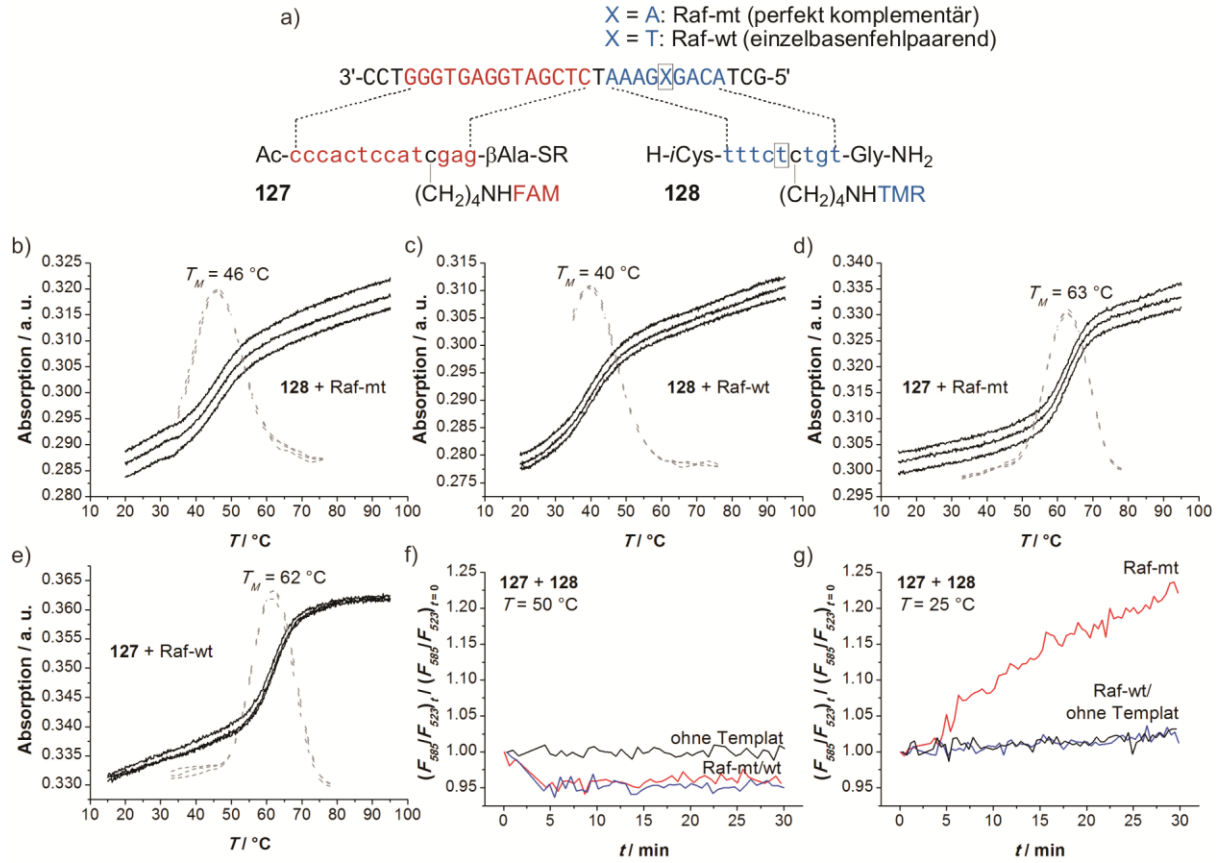
führte. Sie reichte offenbar nicht aus, um eine Aggregation der Sonden vollständig zu unterdrücken. Die Selbstkomplementarität und die damit verbundene Neigung zur Aggregation der Isocysteiny-PNAs stellten in dem verwendeten Sequenzkontext ein inhärentes Problem dar. Beim Vergleich der Sequenz des in vorangegangenen Arbeiten<sup>[65,171,173,175]</sup> als Templat verwendeten H-Ras-Gensegments des Schweins mit der des hier genutzten Segments des Menschen fiel auf, dass sich zwei Einzelbasensubstitutionen (A→C, T→C) in der Bindungsstelle der Isocysteiny-PNAs befinden. Erst durch die auf der Sondenseite benötigten Guanine wurden die beiden selbstkomplementären Triplets geschaffen, die nur durch eine Fehlpaarung separiert sind (vgl. Abbildung 22a). Zusätzlich verstärkte die größere Länge und der mit mehr als 50% hohe Purinanteil der PNA-Sonden deren Hydrophobizität. Eine Verschiebung der PNAs entlang des Templats wäre nicht empfehlenswert. Eine hohe Hybridisierungsdiskriminierung von einzelbasenfehlpaarender DNA ist nur für eine in der Mitte der Sonde befindliche Fehlpaarung zu erwarten.<sup>[173]</sup> Die vielversprechendste Möglichkeit zur Umgehung der Selbstkomplementarität bot ein Wechsel der Zielsequenz. Im Folgenden wurden daher templatgesteuerte Reaktionen an einem DNA-Segment untersucht, welches die V600E-Einzelbasenmutation des menschlichen B-Raf-Gens umspannt.

### 4.2.5 Templatgesteuerte chemische PNA-Verknüpfung am B-Raf-Templat

Als Ausgangspunkt für die templatvermittelte chemische Verknüpfung am B-Raf-Templat wurde der FAM-markierte PNA-βAlanylthioester **127** und die TMR-markierte Isocysteiny-PNA **128** synthetisiert. Die Sonden hybridisieren am DNA-Templat unter Ausbildung einer ungepaarten Templatbase, und der Fluorophorabstand im Verknüpfungsprodukt beträgt zehn PNA-Monomereinheiten, wenn das interne Dipeptid als ein PNA-Monomer gezählt wird. Der Sequenzausschnitt des B-Raf-Gens wurde so gewählt, dass sich an beiden Enden jeweils drei zusätzliche Nukleotide befinden, die keine Basenpaarungen mit den PNA-Sonden ausbilden (Abbildung 24a). Diese Vorgehensweise gewährleistete in späteren Optimierungsprozessen Spielraum für die Sondenlängen.

Zunächst wurden Denaturierungsexperimente der PNA-Sonden mit den DNA-Templaten Raf-mt und Raf-wt durchgeführt. Die Schmelztemperatur ( $T_M$ , berechnet aus dem Maximum der ersten Ableitung der Schmelzkurve) des Duplexes aus der Isocysteiny-PNA **128** und dem perfekt komplementären Templat Raf-mt betrug 46 °C, wohingegen der einzelbasenfehlgepaarte Duplex **128**•Raf-wt einen um 6 °C erniedrigten  $T_M$  aufwies (Abbildung 24b, c). Der

## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 24:** a) Der FAM-markierte PNA-βAla-Thioester **127** hybridisiert am Raf-Templat unter Ausbildung einer ungepaarten Templatbase neben der TMR-markierten *i*Cys-PNA **128** ( $R = (\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ ). b)–e) Schmelzkurven (—) der PNA-Sonden **127** und **128** mit den DNA-Templaten Raf-mt und Raf-wt und deren erste Ableitungen (---) (500 nM Sonden und DNA-Templat, 10 mM TRIS, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 8.0,  $\lambda = 260$  nm, Dreifachmessung). f), g) Relative Änderung des FRET-Signals für die Umsetzung des PNA-Thioesters **127** mit der *i*Cys-PNA **128** in Gegenwart des komplementären Templates Raf-mt, des einzelbasenfehlpaarenden Templates Ras-wt sowie ohne Templat (1 μM Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 25^\circ\text{C}$  oder  $50^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 470$  nm).

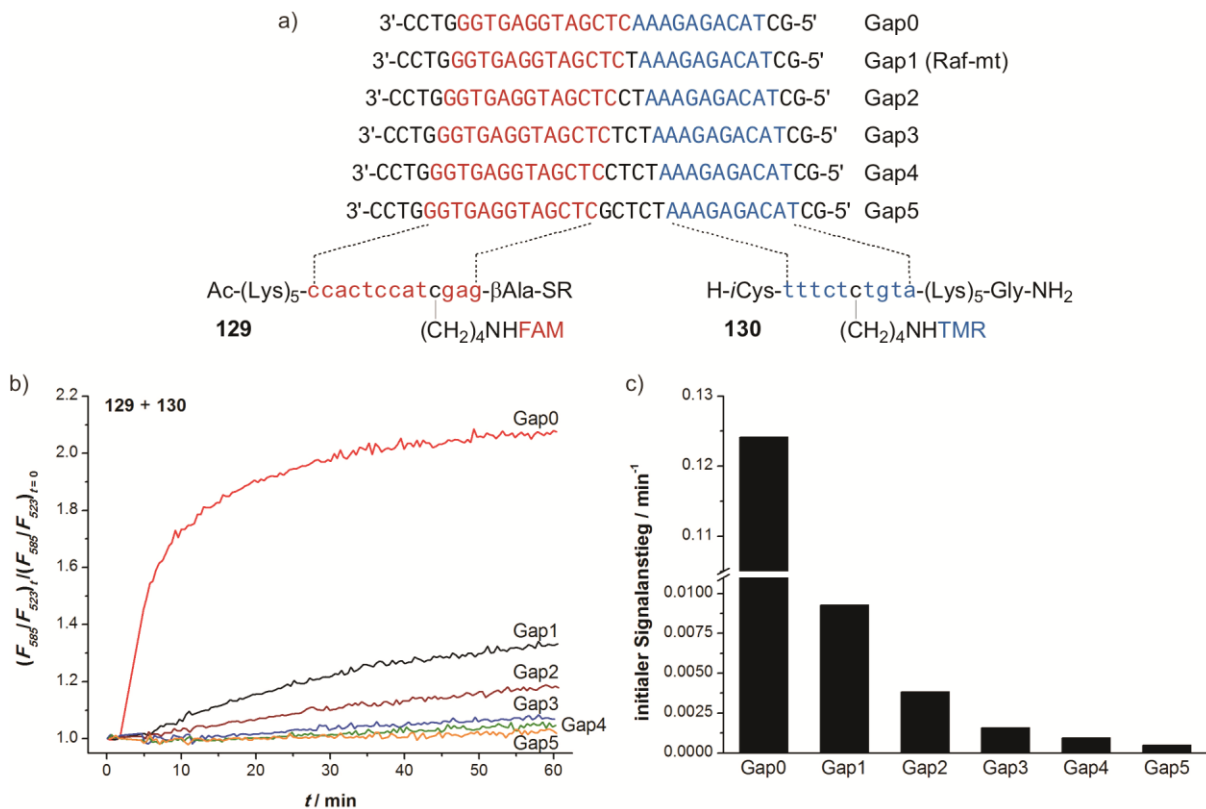
sigmoidale Verlauf der Schmelzkurven sprach für eine reversible Duplexbildung von **128** mit der komplementären DNA, was auf eine verbesserte Löslichkeit der Isocysteiny-PNA in Puffer schließen ließ. Die Schmelztemperaturen der Duplexe aus dem PNA-Thioester **127** bzw. aus dessen Hydrolyseprodukt (bei Denaturierungsexperimenten ist durch die lange Inkubationszeit bei hohen Temperaturen von einer Hydrolyse der Thioester auszugehen) und Raf-mt bzw. Raf-wt waren nahezu identisch ( $63^\circ\text{C}$  bzw.  $62^\circ\text{C}$ ), was aufgrund der Position der Einzelbasensubstitution fernab der Bindungsstelle zu erwarten war (Abbildung 24d, e). Anschließend wurden die Sonden bei einer Konzentration von 1 μM in Gegenwart und in Abwesenheit der DNA-Template umgesetzt und der Reaktionsverlauf fluorometrisch verfolgt. Bei einer Reaktionstemperatur von  $50^\circ\text{C}$  war nach 30 min in keinem Fall ein Anstieg des



FRET-Signals zu beobachten. Erst bei Verringerung der Temperatur auf 25 °C konnte bei Anwesenheit der komplementären DNA ein 1.23-facher Signalanstieg gemessen werden (Abbildung 24f, g). Dieser ließ auf eine nur sehr langsam ablaufende templatgesteuerte Reaktion schließen, was auf eine zu geringe effektive Molarität der Reaktanden im Sonden-Templat-Komplex zurückgeführt wurde.

#### 4.2.6 Optimierung der Architektur des ternären Sonden-Templat-Komplexes

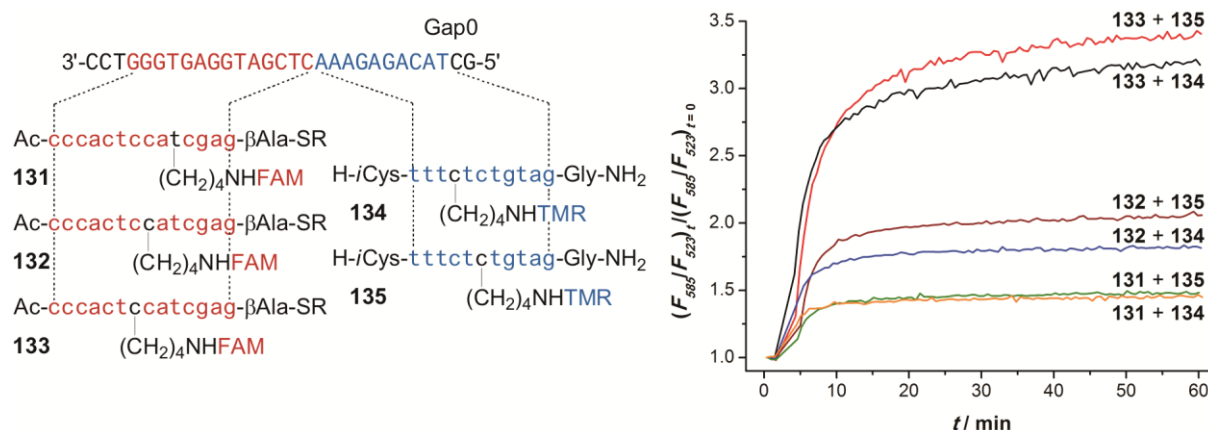
Frühere Arbeiten zeigten, dass sich die Ausbildung einer ungepaarten Templatbase zwischen den hybridisierten PNA-Sonden im Sequenzkontext des H-Ras-Gensegments des Schweins im Vergleich zu einer nahtlosen Hybridisierung nur wenig hemmend auf die Geschwindigkeit der Verknüpfungsreaktion auswirkte.<sup>[171]</sup> Andererseits wurde über einen merklichen Einfluss der Anzahl an ungepaarten Nukleotiden auf die Geschwindigkeiten von templatvermittelten Transferreaktionen berichtet.<sup>[190]</sup> Daher wurde der Einfluss der Architektur des Sonden-Templat-Komplexes im vorliegenden Sequenzkontext untersucht. Die reaktiven Gruppen der



**Abbildung 25:** a) Die durch die Template Gap0–5 erzeugten ternären Komplexe besitzen eine unterschiedliche Anzahl an ungepaarten Templatbasen ( $R = (CH_2)_2SO_3H$ ). b) Relative Änderung des FRET-Signals für die Umsetzung des PNA-Thioesters **129** mit der *i*Cys-PNA **130** in Gegenwart der DNA-Template Gap0–5. c) Anfangsgeschwindigkeit der Signalanstiege (1  $\mu$ M Sonden und DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 40$  °C,  $\lambda_{ex} = 470$  nm).



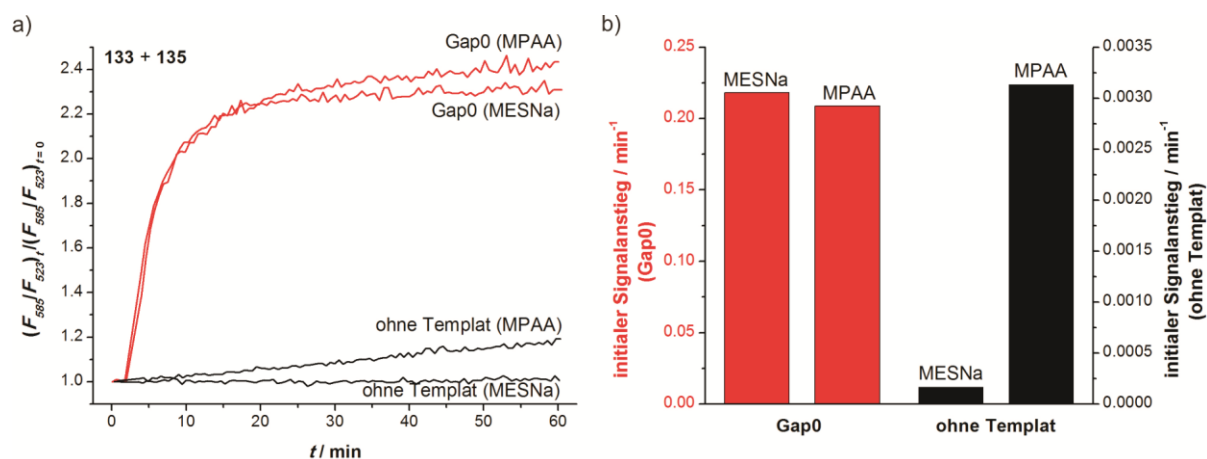
PNA-Konjugate **129** und **130** werden durch die DNA-Template Gap0–5 in unterschiedlichem Abstand zueinander angeordnet. Die Ergebnisse attestierten einen ausgeprägten Effekt auf die Geschwindigkeit des Signalanstiegs (Abbildung 25). So erzeugte das Templat Gap0, an dem beide Sonden in direkter Nachbarschaft hybridisierten, einen 13-fach höheren initialen Signalanstieg als die ursprüngliche DNA Raf-mt, die eine ungepaarte Templatbase ausbildet (Gap1). Die weitere Vergrößerung des Abstands der Reaktanden in ternären Komplexen mit den Templaten Gap2–5 führte im Vergleich zur Reaktion an Gap0 zu 32–256-fach verlangsamten Anstiegen. Im Zuge dieser Erkenntnis wurden die an verschiedenen Positionen fluorophormarkierten PNA-Thioester **131–133** mit den verlängerten Isocysteinyl-PNAs **134** und **135** in Gegenwart des Templats Gap0 zur Reaktion gebracht. Die Umsetzungen des Thioesters **133** generierten dabei die größten Signalanstiege (mehr als 3-fach nach 1 h), wobei die verwendete Isocysteinyl-PNA keinen signifikanten Einfluss hatte. Daher ließ sich keine direkte Abhängigkeit von den Fluorophoranbindungsstellen ableiten (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung der PNA-Thioester **131–133** mit den iCys-PNAs **134** und **135** am Templat Gap0 (1  $\mu$ M Sonden und DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 40$  °C,  $\lambda_{ex} = 470$  nm, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H).

#### 4.2.7 Einfluss der Thioesterreaktivität auf die Geschwindigkeit der PNA-Verknüpfung

Aus Untersuchungen von Johnson und Kent über die Geschwindigkeit der NCL ist bekannt, dass die Reaktivität des Thioesters eine entscheidende Rolle spielt.<sup>[168]</sup> Anhand der Verknüpfungsreaktion **133** + **135** wurde überprüft, ob durch den Einsatz von reaktiveren Thioestern eine Erhöhung der Geschwindigkeit der templatvermittelten Verknüpfung erzielt werden kann. Dazu wurde eine Reaktion in Gegenwart des Thioladditivs 4-Mercaptophenyl-essigsäure (MPAA) durchgeführt, welches den entsprechenden Arylthioester durch Umthioesterung aus dem Mercaptopropionsäurethioester *in situ* erzeugte. Zum Vergleich wurde die

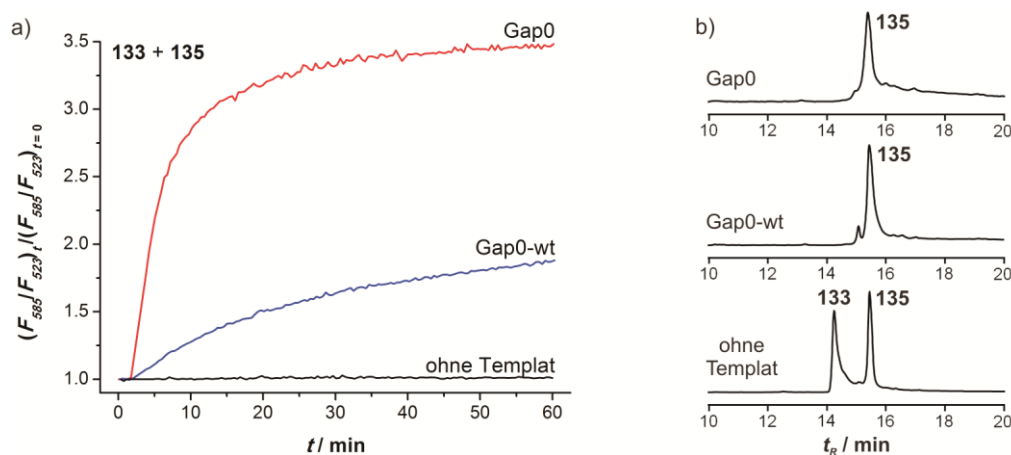


**Abbildung 27:** a) Relative Änderung des FRET-Signals für die templatvermittelte und die templatunabhängige Umsetzung des PNA-Thioesters **133** mit der *i*Cys-PNA **135** in Gegenwart der Thioladditive MESNa oder MPAA. b) Anfangsgeschwindigkeiten der durch Gap0 hervorgerufenen (■) bzw. ohne Templat gemessenen (■) Signalanstiege (1  $\mu\text{M}$  Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM MESNa oder MPAA, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 40^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{ nm}$ ).

Umsetzung ebenfalls mit dem durch MESNa generierten, weniger reaktiven Alkylthioester verfolgt. Während die templatunabhängigen Umsetzungen die erwarteten Abstufungen in der Reaktivität aufwiesen (der MPAA-Thioester reagierte 19 mal schneller als der MESNA-Thioester), konnte für die templatgesteuerten Verknüpfungen erstaunlicherweise kein Unterschied in den Signalaraten festgestellt werden (Abbildung 27). Dieser Befund verdeutlicht die Unterschiede von bimolekularen und templatgesteuerten Reaktionen. Während beide prinzipiell von höheren Reaktivitäten profitieren können, wird die Geschwindigkeit der letzteren auch von der effektiven Molarität der Reaktanden bestimmt. Offensichtlich ist die Ausbildung der chemischen Bindung in diesem Fall nicht geschwindigkeitsbestimmend. Dass der Signalanstieg die Hybridisierungskinetiken der Sonden widerspiegelt, die normalerweise im Bereich von Millisekunden liegen,<sup>[245]</sup> ist ebenfalls nicht plausibel. Wahrscheinlich kommt es nach der Ausbildung des Sonden-Templat-Komplexes zu einer konformativen Umordnung, welche die Reaktanden in hoher effektiver Molarität anordnet und so die Geschwindigkeit des Signalanstiegs bestimmt. Da die reaktiveren Arylthioester also nur die Hintergrundreaktion beschleunigten, wurde von der Verwendung von MPAA als Thioladditiv abgesehen.

#### 4.2.8 Einzelbasenspezifität am Gap0-Templat und PNA-Verknüpfung am B-Raf-Templat im durchgehend gepaarten ternären Komplex

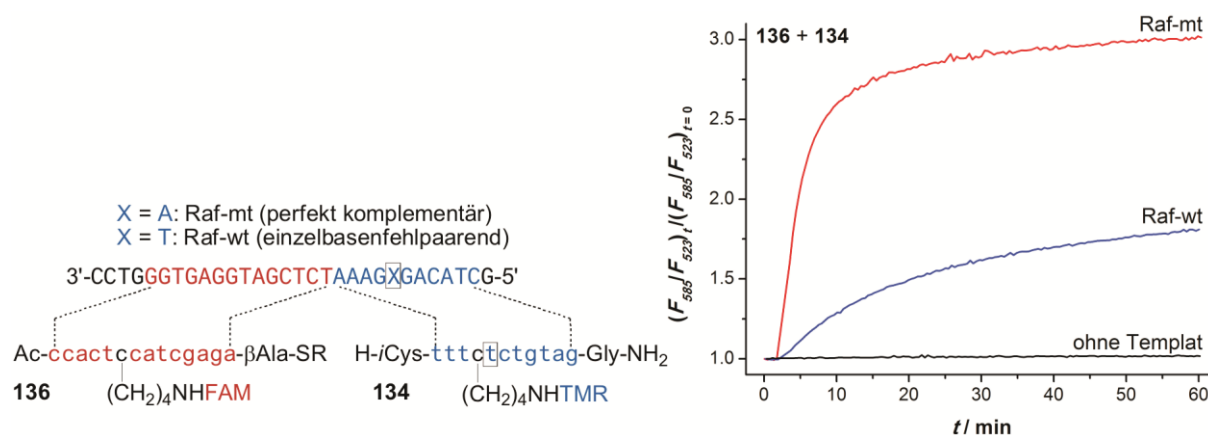
Zur Feststellung der Einzelbasenspezifität  $S$  der Reaktion erfolgte eine Umsetzung von **133** und **135** in Anwesenheit eines einzelbasenfehlpaarenden Templats (Gap0-wt), welches den



**Abbildung 28:** a) Relative Änderung des FRET-Signals für die Umsetzung des PNA-Thioesters **133** mit der iCys-PNA **135** in Gegenwart des komplementären Templates Gap0, des einzelbasenfehlpaarenden Templates Gap0-wt sowie ohne Templat. b) HPLC-Spuren nach 1 h Reaktionszeit (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 40$  °C,  $\lambda_{ex.} = 470$  nm, HPLC: Gradient 3,  $\lambda = 260$  nm).

gleichen Nukleotidaustausch (A $\rightarrow$ T) wie das ursprüngliche Templat Raf-wt enthielt (Abbildung 28a). Für  $S$  ergab sich ein Wert von 9. Zur Bestimmung der Verknüpfungsausbeute wurden die fluoreszenzspektroskopisch vermessenen Reaktionslösungen mittels HPLC analysiert (Abbildung 28b). In Abwesenheit des Templates lagen die Signale beider Sonden vor, während in Anwesenheit von Gap0 oder Gap0-wt das Signal des FAM-markierten Thioesters **133** vollständig verschwand. Da kein neues Signal auftrat, musste davon ausgegangen werden, dass das Verknüpfungsprodukt keine scharfe Retentionszeit besaß und nur allmählich von der Säule eluierte. Andererseits könnte es trotz der sauren Bedingungen einer Wechselwirkung mit dem Templat unterliegen, welche eine Retention verhinderte. Die lange Thioestersonde könnte davon ebenso betroffen sein, da eine vollständige Umsetzung sowohl an Gap0 als auch an Gap0-wt aufgrund der unterschiedlichen Anstiege der FRET-Signale nicht wahrscheinlich ist. Demnach konnte zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über die Ausbeute der templatgesteuerten PNA-Verknüpfung getroffen werden.

Im nächsten Schritt musste das Ligationssystem für den Nachweis der ursprünglichen Zielsequenz angepasst werden. Dafür wurde ein neuer FAM-markierter PNA- $\beta$ Alanylthioester **136** synthetisiert, der mit dem Templat Raf-mt und der Isocysteiny-PNA **134** einen durchgehend gepaarten ternären Komplex ausbildet. Die Reaktion lieferte in Gegenwart der komplementären DNA Raf-mt nach 1 h bei 40 °C einen dreifachen Anstieg des FRET-Signals (Abbildung 29). Wichtig im Hinblick auf eine templatgesteuerte Umsetzung während der



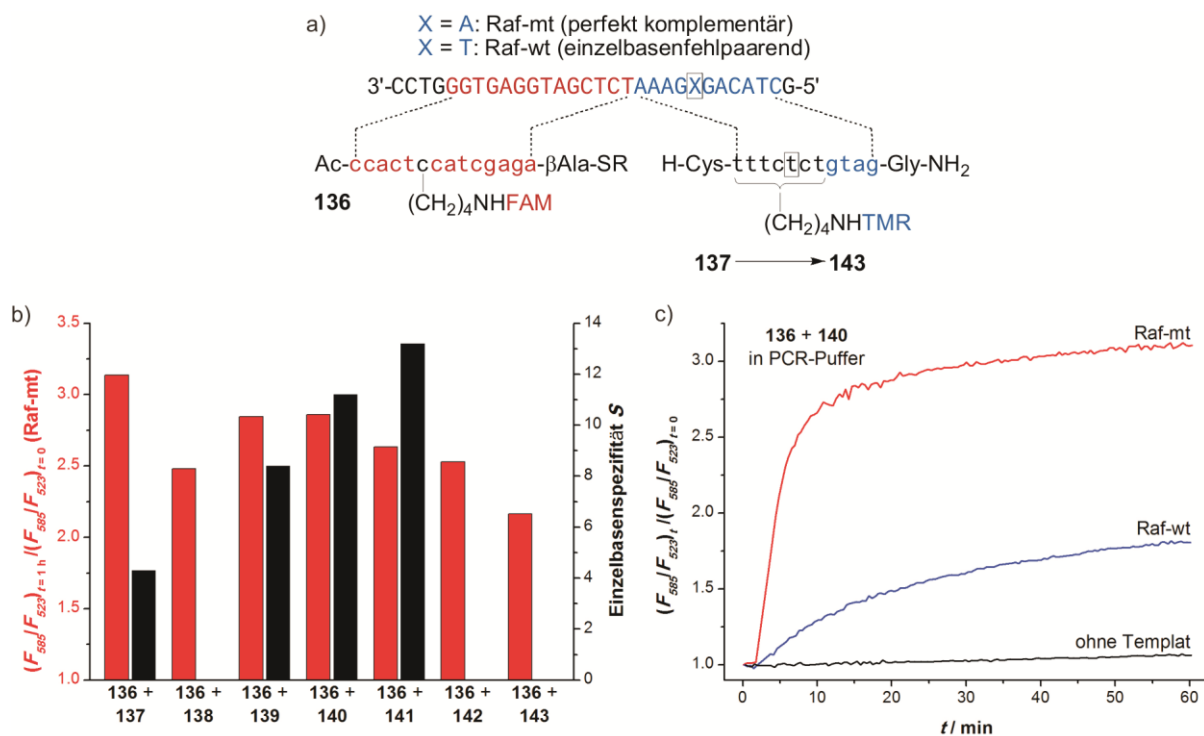
**Abbildung 29:** Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung des PNA-Thioesters **136** mit der *i*Cys-PNA **134** in Gegenwart des komplementären Templats Raf-mt, des einzelbasenfehlpaarenden Templats Raf-wt sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 40$  °C,  $\lambda_{ex} = 470$  nm, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H).

PCR ist außerdem der 1.8-fache Anstieg nach nur 2 min, welcher zu diesem Zeitpunkt mehr als 200 mal größer war als in Abwesenheit des Templats. Die Reaktion hatte bezüglich der fehlpaarenden DNA Raf-wt eine Einzelbasenspezifität von  $S = 9$ .

#### 4.2.9 Einfluss der TMR-Anbindungsstelle auf den Signalanstieg und die Einzelbasenspezifität der templatgesteuerten PNA-Verknüpfung

Um eine Aussage über den Einfluss der Fluorophoranbindungsstellen auf die erzielbaren Anstiege und Einzelbasenspezifitäten treffen zu können, wurden unter Verwendung der lysinmodifizierten PNA-Monomere **110** bzw. **111** die Aminothiol-PNAs **137–143** synthetisiert (Abbildung 30a). Die sequenzinterne Position des TMR-Fluorophors war für jede Sonde jeweils um ein PNA-Monomer in Richtung des C-Terminus verschoben. Um später den Einfluss der Reaktivität der 1,2-Aminothiolstruktur untersuchen zu können, wurden die PNAs als Cysteinderivate hergestellt. Der nach 1 h gemessene Signalanstieg in Gegenwart des komplementären Templats Raf-mt war für die Reaktion des FAM-markierten Thioesters **136** mit der Cysteinyln-PNA **137** am größten. Hier befand sich der TMR-Fluorophor direkt neben der Verknüpfungsstelle. Weitere Maxima lagen für die Verknüpfung von **136** mit **139** bzw. **140** vor. Mit weiter zunehmendem Abstand des TMR-Farbstoffs in den PNAs **141–143** nahm der Signalanstieg wieder ab (Abbildung 30b). Die vier Reaktionen mit den höchsten Endwerten wurden bezüglich ihrer Einzelbasenspezifität  $S$  untersucht. Diese stieg mit größer werdender Distanz zwischen den Fluorophoren von  $S = 4$  (**136** + **137**) auf  $S = 13$  (**136** + **141**). Möglicherweise geht der Anteil am FRET-Signal, der im ternären Eduktkomplex generiert

## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 30:** a) Die Anbindungsstelle des TMR-Fluorophors ist in den Cys-PNAs **137–143** jeweils um ein PNA-Monomer in Richtung des C-Terminus verschoben ( $R = (CH_2)_2SO_3H$ ). b) Relative Änderung des FRET-Signals nach einstündiger Reaktion des PNA-Thioesters **136** mit den Cys-PNAs **137–143** in Gegenwart des komplementären Templates Raf-mt (■) sowie die Einzelbasenspezifitäten bezüglich des einzelbasenfehlpaarenden Templates Raf-wt ausgewählter Ligationen (■). c) Relative Änderung des FRET-Signals der Reaktion **136 + 140** in PCR-Puffer (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4, oder PCR „high specificity“ Puffer + 10 mM MESNa,  $T = 40^\circ C$ ,  $\lambda_{ex.} = 470$  nm).

wird, mit zunehmendem Fluorophorabstand zurück, während jener durch die Verknüpfungsreaktion hervorgerufene ansteigt. Da diese eine zusätzliche Ebene der Einzelbasenspezifität einbringt (nicht jeder fehlgepaarte ternäre Komplex führt zur Bildung eines Produkts, wenn die Dissoziation der kürzeren Cysteinyl-PNAs schnell ist), könnte so die Zunahme von  $S$  erklärt werden. Das Sondenpaar **136 + 140** bildete einen guten Kompromiss aus Signalanstieg und Einzelbasenspezifität und wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die angestrebte PNA-Verknüpfung während der PCR erforderte die Kompatibilität der Verknüpfungschemie mit den in der PCR verwendeten Puffersystemen. Die Reaktion von **136** und **140** wurde daher in PCR-Puffer „high specificity“ der Firma *peqlab* angesetzt, dem 10 mM MESNa zugesetzt waren. Der erzielte 3.1-fache Signalanstieg nach 1 h in Gegenwart von Raf-mt und die Einzelbasenspezifität von  $S = 10$  waren vergleichbar mit den im bisher verwendeten Ligationspuffer erhaltenen Werten (Abbildung 30c).

#### 4.2.10 Optimierung der Länge der einzelbasenspezifisch bindenden Aminothiol-PNA

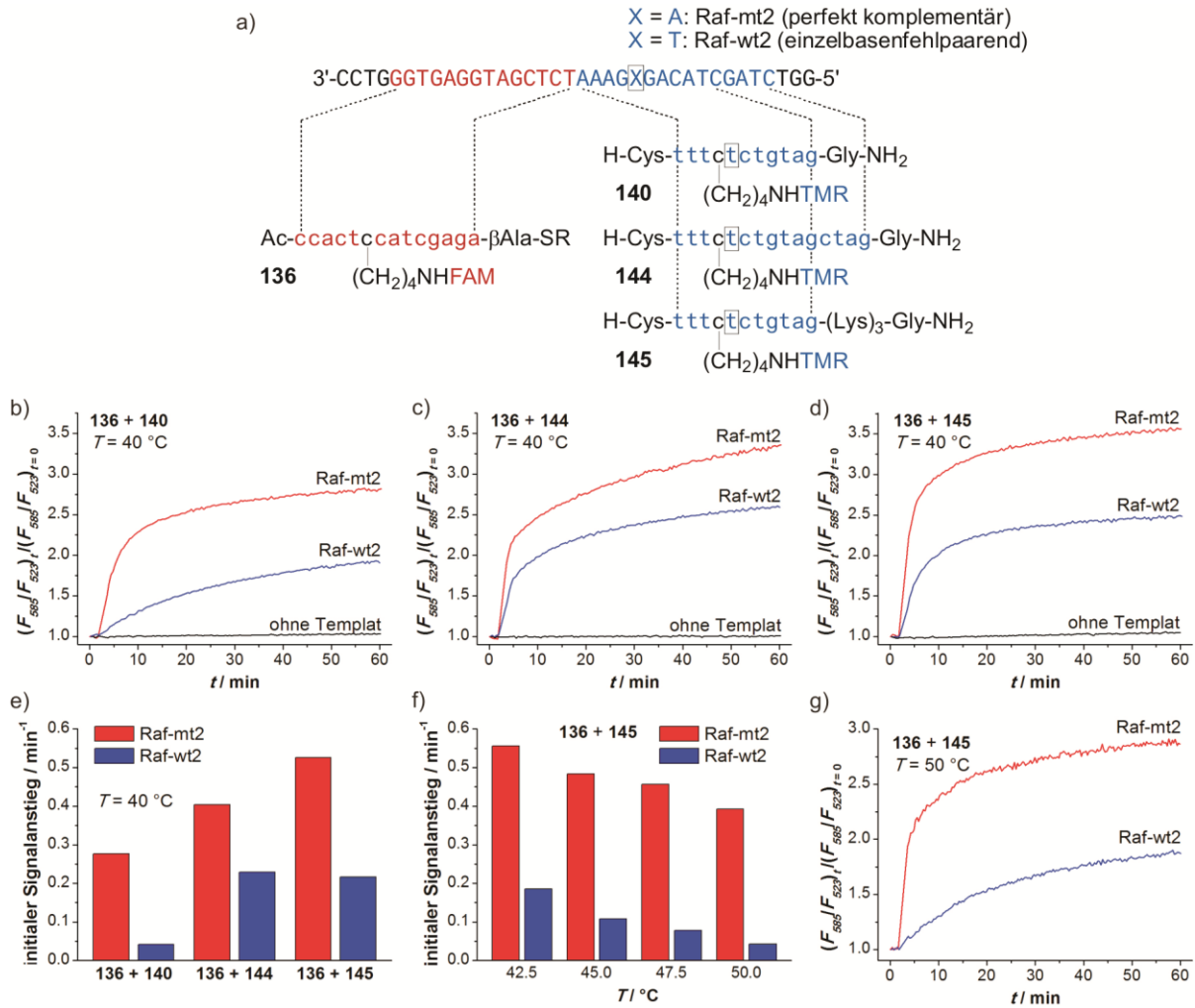
Bei den erhöhten Temperaturen im Primeranlagerungsschritt der PCR müssen die ternären Eduktkomplexe in hohen Konzentrationen vorliegen, um eine schnelle Verknüpfung zu gewährleisten. Daher wurden die Cysteiny-PNAs **144** und **145** synthetisiert, deren Templataffinitäten im Vergleich zu **140** größer ausfallen sollten (Abbildung 31a). Der C-Terminus von **144** war um vier Nukleotide verlängert, während **145** statt der zusätzlichen PNA-Monomere drei Lysine enthielt. Deren protonierte Seitenkettenaminogruppen können ionische Wechselwirkungen mit den deprotonierten Phosphatresten des Templat eingehen. Die Verlängerung der Cysteiny-PNAs erforderte auch eine Verlängerung der Template am 5'-Ende, um die zusätzlichen Watson-Crick-Basenpaarungen bzw. Coulomb-Wechselwirkungen zu ermöglichen. Denaturierungsexperimente mit den neuen Templatent Raf-mt2 und Raf-wt2 belegten eine signifikante Steigerung der Templataffinität der Sonde **144**, deren Duplexe Schmelztemperaturen von 56 °C und 52 °C aufwiesen (Tabelle 1). Die Verlängerung der Sonde **145** durch Lysine bewirkte dagegen kaum eine Erhöhung der Schmelztemperatur ( $\Delta T_M = 1$  °C).

Anschließend wurde der Thioester **136** mit den Cysteiny-PNAs **140**, **144** und **145** und den verlängerten DNA-Templatent bei 40 °C unter den Bedingungen der templatgesteuerten NCL zur Reaktion gebracht (Abbildung 31b–d). Der Signalanstieg fiel mit den beiden längeren Cysteiny-PNAs **144** und **145** größer aus als mit dem kürzeren PNA-Konjugat **140**. Dies ist bemerkenswert, da sich die Schmelztemperaturen der Templatkomplexe von **140** und **144** zwar stark, die von **140** und **145** aber nur unwesentlich unterschieden. Die Reaktion der lysinmodifizierten Sonde **145** lieferte gegenüber der Umsetzung von **144** sowohl größere Signalanstiege in Anwesenheit der Zielsequenz Raf-mt2 als auch niedrigere Signalaraten in Gegenwart des fehlpaarenden Templatent Raf-wt2 (Abbildung 31e). Die im Vergleich zur Reaktion von **136** und **140** verminderte Einzelbasenspezifität ließ sich durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur wiederherstellen. So bewirkte eine Temperaturänderung um 10 °C

**Tabelle 1:** Schmelztemperaturen des PNA-Thioesters **136** sowie der Cys-PNAs **140**, **144** und **145** mit den DNA-Templatent Raf-mt2 und Raf-wt2 (500 nM Sonden und DNA-Templat, 10 mM TRIS, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 8.0).

PNA-Konjugat:	<b>136</b>	<b>140</b>	<b>144</b>	<b>145</b>
Raf-mt2	61 °C	46 °C	56 °C	47 °C
Raf-wt2	61 °C	40 °C	52 °C	41 °C

## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 31:** a) Die Cys-PNAs **144** und **145** sind bezüglich **140** um vier Nukleotide bzw. drei Lysinreste verlängert ( $R = (CH_2)_2SO_3H$ ). b)–d) Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung des PNA-Thioesters **136** mit den Cys-PNAs **140**, **144** bzw. **145** in Gegenwart des komplementären Templats Raf-mt2, des einzelbasenfehlpaarenden Templats Raf-wt2 sowie ohne Templat. e)–f) Anfangsgeschwindigkeiten der Signalanstiege für verschiedene Sondenpaare bzw. für das Paar **136** + **145** bei verschiedenen Temperaturen. g) Relative Änderung des FRET-Signals für die Ligation aus f) bei  $T = 50\text{ °C}$  ( $1\text{ }\mu\text{M}$  Sonden und ggf. DNA-Templat,  $10\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $10\text{ mM MESNa}$ ,  $150\text{ mM NaCl}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $\lambda_{\text{ex.}} = 470\text{ nm}$ ).

einen Rückgang der initialen Signalrate in Anwesenheit von Raf-wt2 um ca. 80%, während sie in Gegenwart von Raf-mt2 nur um ca. 30% abnahm (Abbildung 31f, g). Die daraus resultierende Einzelbasenspezifität von  $S = 9$  bei  $50\text{ °C}$  war mit jener der Reaktion von **136** mit **140** bei  $40\text{ °C}$  vergleichbar. Darüber hinaus war die durch Raf-mt2 verursachte initiale Signalanstiegsrate mit  $0.39\text{ min}^{-1}$  mehr als dreimal höher als die der schnellsten Reaktion am H-Ras-Templat ( $0.11\text{ min}^{-1}$ , vgl. Kapitel 4.2.4).



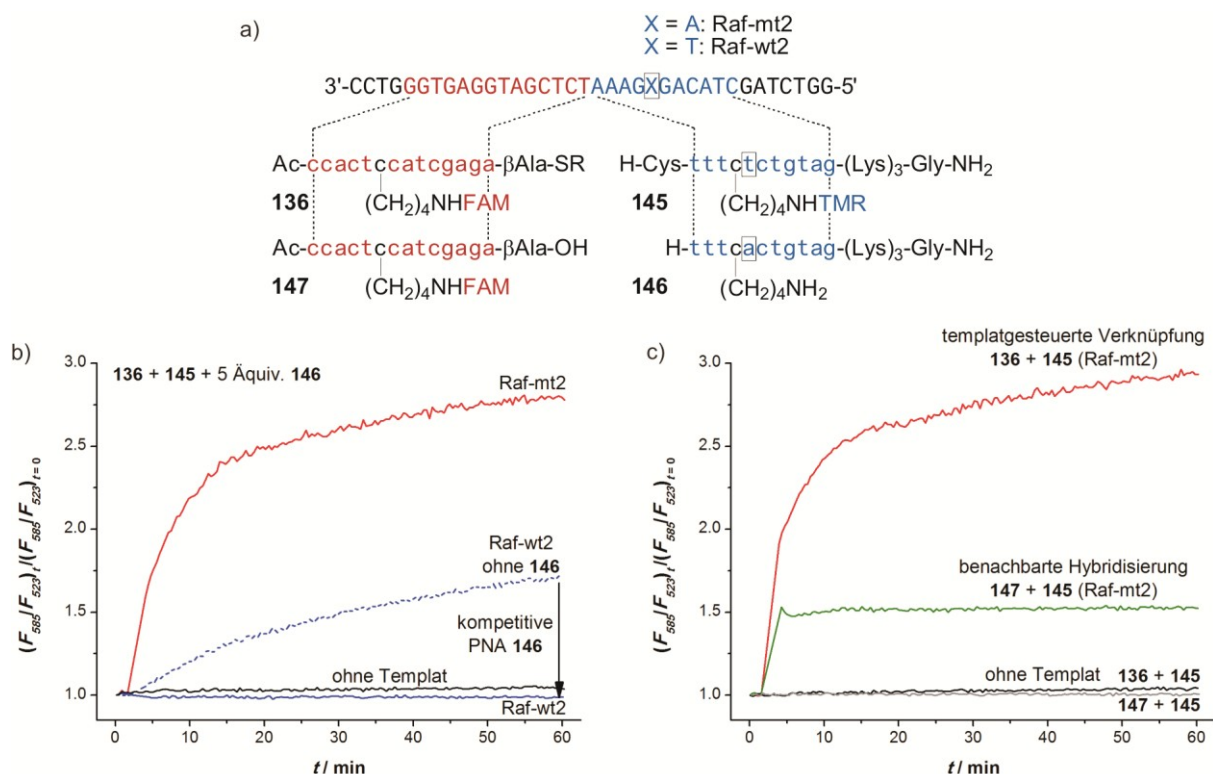
### 4.2.11 Erhöhung der Einzelbasenspezifität durch kompetitive Hybridisierung sowie Vergleich zwischen benachbarter Hybridisierung und chemischer Verknüpfung

Die bisher erzielten Einzelbasenspezifitäten lagen um mehr als eine Größenordnung hinter den von Dose *et al.* für die FRET-basierte Detektion des H-Ras-Gensegments des Schweins berichteten zurück.<sup>[65,175]</sup> So konnten die Autoren den Signalanstieg an einzelbasenfehlpaarendem Templat unter die Detektionsgrenze zurückdrängen, wenn sie nur den Anstieg der Akzeptoremission verfolgten. Dies hatte jedoch einen deutlichen Verlust an Signalintensität zur Folge, da die Abnahme der Donorfluoreszenz nicht mehr in das detektierte Signal einbezogen wurde. Um die Einzelbasenspezifität der Reaktion am B-Raf-Gensegment zu erhöhen, ohne dabei das generierte Signal signifikant zu verringern, wurde die nicht reaktive, nicht fluorogene PNA **146** hergestellt (Abbildung 32a). Diese ist perfekt komplementär zur Wildtyp-DNA Raf-wt2 und konkurriert mit der reaktiven, zur Mutanten-DNA komplementären Cysteinyln-PNA **145** um die Hybridisierung am Templat. In Gegenwart von Raf-wt2 ist der ternäre Komplex **136•146•Raf-wt2** gegenüber **136•145•Raf-wt2** favorisiert und folglich wäre die chemische Verknüpfung von **136** und **145** gestört. Da **146** mit der Zielsequenz Raf-mt2 eine Einzelbasenfehlpaarung ausbildet, war an diesem Templat nicht mit einer nennenswerten Beeinflussung der Produktbildung zu rechnen. In der Tat lieferte die Verknüpfungsreaktion **136 + 145** in Gegenwart von 5 Äquiv. der kompetitiven PNA **146** am Templat Raf-mt2 nur einen geringfügig kleineren Signalanstieg als in Abwesenheit von **146**. Dagegen wurde die Ligation an Raf-wt2 durch **146** so stark zurückgedrängt, dass kein Anstieg des FRET-Signals detektiert werden konnte (Abbildung 32b). Im Vergleich dazu wurde in Abwesenheit von **146** nach 1 h bereits ein Zuwachs um den Faktor 1.7 verzeichnet. Bemerkenswerterweise wurde die Verknüpfung in Gegenwart von Raf-wt2 durch die kompetitive PNA sogar unter das Niveau der Hintergrundreaktion verlangsamt. Dieses Phänomen kann durch das gleichzeitige Vorliegen des ternären Komplexes **136•146•Raf-wt2** und ungebundener Cysteinyln-PNA **145** erklärt werden. Weder im hybridisierten noch im ungebundenen Zustand ist die Konzentration der reaktiven PNA-Konjugate hoch genug für eine erfolgreiche Verknüpfungsreaktion. Die Zugabe einer um das fehlpaarende Templat konkurrierenden, nicht reaktiven Sonde ist also ein hervorragendes Mittel, um hohe Einzelbasenspezifitäten bei gleichzeitig nahezu unveränderter Ligationseffizienz am perfekt komplementären Templat zu erzielen.

Im weiteren Verlauf stellte sich die Frage nach dem Anteil der Verknüpfungsreaktion und der benachbarten Hybridisierung der Sonden am Anstieg des FRET-Signals. Daher wurde der



## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 32:** a) Die nicht reaktive, nicht TMR-markierte PNA **146** konkurriert mit der Cys-PNA **145** um die Hybridisierung am Templat. Die PNA-Carbonsäure **147** ist ebenfalls nicht zu einer Verknüpfungsreaktion befähigt ( $R = (CH_2)_2SO_3H$ ). b), c) Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung des PNA-Thioesters **136** mit der Cys-PNA **145** b) in Gegenwart von 5 Äquiv. **146** und der Template Raf-mt2, Raf-wt2 sowie ohne Templat oder c) im Vergleich mit dem durch die benachbarte Hybridisierung von **147** mit **145** erzeugten Signal (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, ggf. 5  $\mu$ M **146**, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 50^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{ex} = 470\text{ nm}$ ).

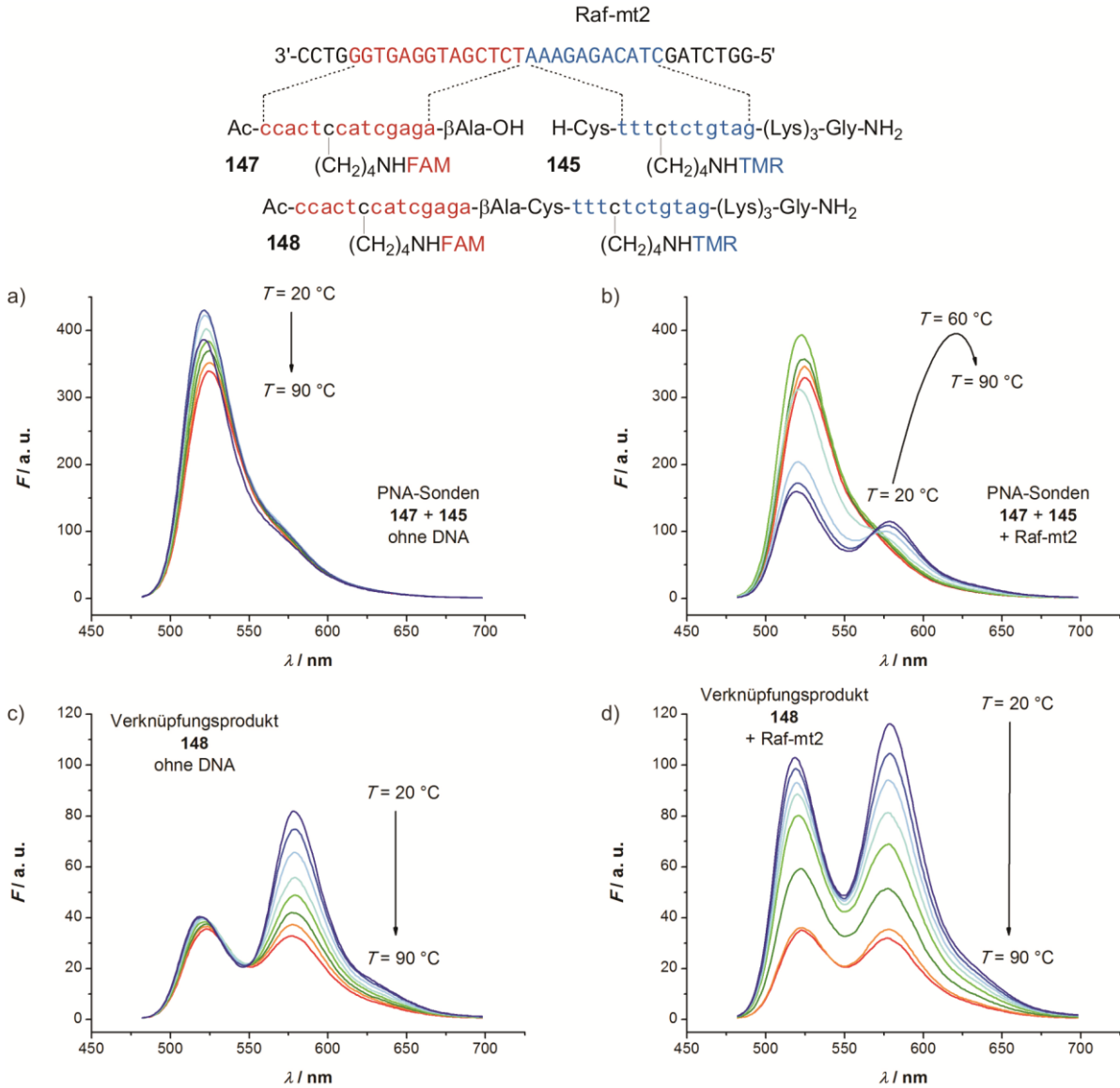
PNA-Thioester **136** mit NaOH verseift und chromatografisch gereinigt. Die so erhaltene freie PNA-Carbonsäure **147** (Abbildung 32a), die zu keiner Verknüpfungsreaktion befähigt ist, wurde zusammen mit der Cysteinyl-PNA **145** den Bedingungen der templatgesteuerten Ligation ausgesetzt. Sofort nach Zugabe von Raf-mt2 kam es zu einem 1.5-fachen Anstieg des FRET-Signals, welches zeitlich konstant blieb. Der durch die Verknüpfung der reaktiven Sonden **136** und **145** erzeugte Signalanstieg war dagegen nach 1 h ca. viermal größer (Abbildung 32c). Hierdurch wird der Vorteil einer chemischen Fixierung der Donor- und Akzeptorfarbstoffe im Verknüpfungsprodukt deutlich. Das abweichende Verhalten der beiden Sondenpaare ist der hohen Temperatur und den Unterschieden von Gleichgewichts- und nicht-Gleichgewichtssystemen geschuldet. Bei Temperaturen nahe der Schmelztemperatur wird nur ungefähr die Hälfte der Cysteinyl-PNAs in einem dynamischen Gleichgewicht mit den Templatmolekülen assoziiert sein ( $T_M(\mathbf{145} \cdot \text{Raf-mt2}) = 47^\circ\text{C}$ ). Ohne die Möglichkeit der Verknüpfung bleibt dieser Anteil über die Zeit konstant (**147** + **145**). Im Gegensatz dazu

führen ternäre Komplexe des reaktiven Sondenpaars **136 + 145** zur Bildung von Ligationsprodukten, welche das Templat mit hoher Affinität binden. Dadurch wird ein Teil der Templatmoleküle quasi aus dem Gleichgewicht entfernt. Vorher nicht mit Cysteinyl-PNAs assoziierte DNA-Template können nun durch die Einstellung eines neuen Hybridisierungsgleichgewichts die Bildung neuer Produktmoleküle fördern, sodass ein höherer Anstieg des FRET-Signals resultiert.

### **4.2.12 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Verknüpfungsprodukts und Bestimmung der Ausbeute der templatgesteuerten PNA-Verknüpfung**

Bisher konnte die Ausbeute der templatgesteuerten PNA-Verknüpfung nicht ermittelt werden, da sich das Ligationsprodukt einer HPLC-analytischen Detektion entzog. Eine alternative Möglichkeit zur Quantifizierung bestand im Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach erfolgter Reaktion mit denen des Verknüpfungsprodukts **148**. Daher wurde dieses durch Umsetzung von **136** mit **145** bei erhöhten Konzentrationen (100  $\mu$ M) hergestellt und mittels HPLC gereinigt. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von **148** sowie des entsprechenden Sondenpaars **147** (hydrolysiertes **136**) und **145** in Gegenwart und in Abwesenheit der komplementären DNA Raf-mt2 bei verschiedenen Temperaturen. Die Anregung des Donorfluorophors erfolgte in allen Fällen bei 470 nm, um eine direkte Anregung des TMR-Akzeptors zu minimieren. Ohne Templat zeigte das Sondenpaar bei 90 °C eine starke FAM-Fluoreszenz, die bei Abkühlung auf 20 °C aufgrund der schwachen Temperaturabhängigkeit der Fluoresceinemission leicht zunahm (Abbildung 33a). Bei keiner Temperatur kam es zu einem FRET zwischen den Fluorophoren. In Gegenwart des Templats wurden von 90–70 °C identische Emissionen wie in dessen Abwesenheit gemessen (Abbildung 33b). Bei 60 °C war die FAM-Fluoreszenz leicht erhöht, was aus der Hybridisierung der FAM-markierten PNA **147** mit Raf-mt resultierte. Der Fluorophor schien im PNA-Einzelstrang einer schwachen Löschung durch Stoßdeaktivierung zu unterliegen, welche im PNA-DNA-Duplex teilweise aufgehoben wurde. Es kam noch nicht zu einem Energietransfer, da bei dieser Temperatur die TMR-markierte Cysteinyl-PNA **145** größtenteils ungebunden vorlag. Bei Abkühlung auf 50 °C bildeten sich detektierbare Mengen des ternären Komplexes **147•145•Raf-mt2**, welche eine leichte Abnahme der FAM-Emission bei gleichzeitiger Zunahme der TMR-Fluoreszenz bewirkten. Trotzdem war bei der für die templatgesteuerte PNA-Verknüpfung relevanten Reaktionstemperatur von 50 °C der FRET nur schwach ausgeprägt. Erst bei Abkühlung auf 40–20 °C lagen beide Sonden größtenteils hybridisiert vor.

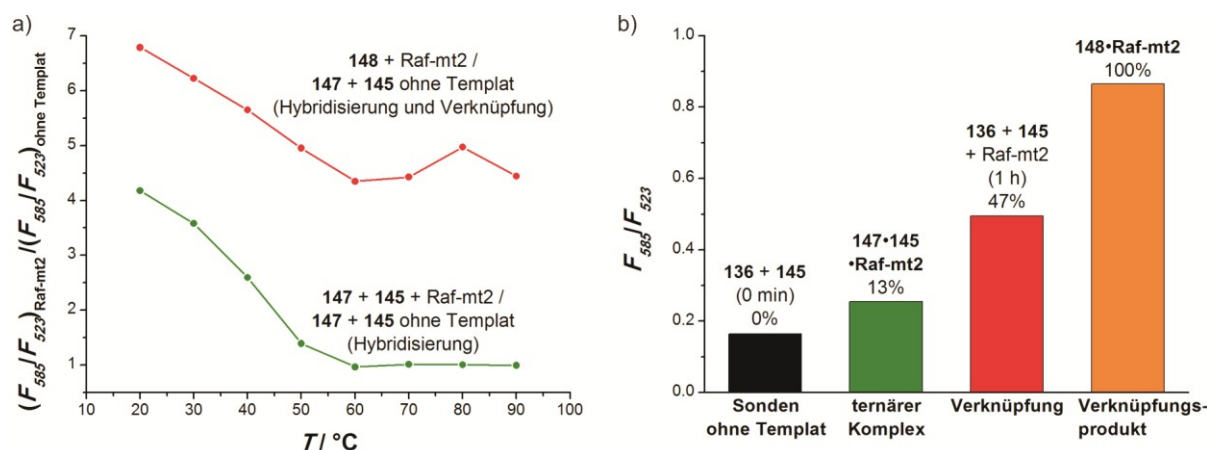
## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 33:** Fluoreszenzspektren des a), b) Sondenpaars **147 + 145** und des c), d) Verknüpfungsprodukts **148** in a), c) Abwesenheit und in b), d) Anwesenheit des komplementären DNA-Templats Raf-mt2 (1 μM Sonden, Verknüpfungsprodukt und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 20\text{--}90\text{ °C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{ nm}$ ).

Das Fluoreszenzspektrum des Ligationsprodukts **148** zeigte in Abwesenheit von Raf-mt2 bei allen Temperaturen einen effizienten FRET (Abbildung 33c). Die FAM-Emission war im Vergleich zum Sondenpaar stark vermindert und unterlag nur einer minimalen Temperaturabhängigkeit, wohingegen diese für den TMR-Fluorophor stark ausgeprägt war. In Gegenwart des Templats erfuhr die FAM-Fluoreszenz bei Temperaturen unterhalb oder nahe der Schmelztemperatur des Produkt-Templat-Duplexes (70 °C) eine stärkere Intensivierung als die TMR-Emission (Abbildung 33d). Der Grund hierfür könnte wieder in einer Löschung der FAM-Emission im Einzelstrang liegen, welche im Duplex **148**•Raf-mt2 aufgehoben wird.

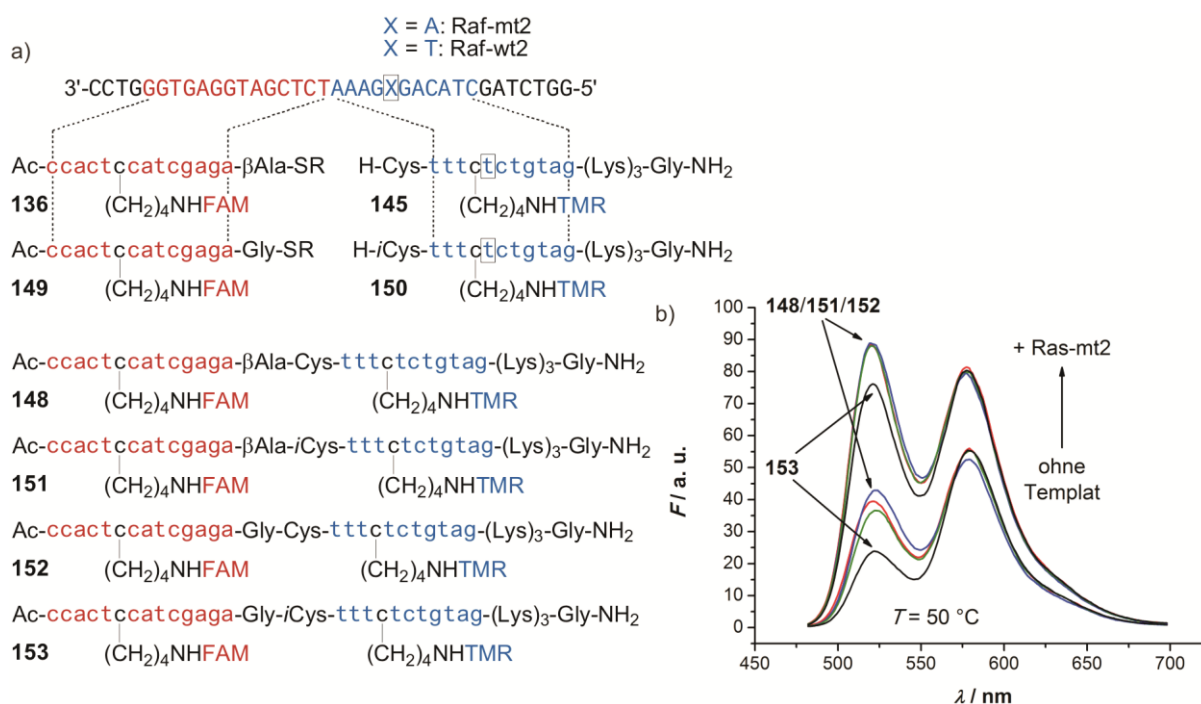
Aus den gemessenen Daten konnten nun die relativen Signalanstiege im ternären Eduktkomplex sowie im Produktduplex ermittelt werden (Abbildung 34a). Durch die benachbarte Hybridisierung der Sonden am Templat kam es bei 20 °C zu einem 4.2-fachen Anstieg des FRET-Signals. Bei der Reaktionstemperatur von 50 °C war dagegen nur noch eine 1.4-fache Steigerung möglich. Die Werte für den Verknüpfungsprodukt-Templat-Duplex stellen eine Obergrenze für das Reaktionssystem dar. Sie entsprechen dem Anstieg, der durch die Zugabe der DNA zum Sondenpaar und eine quantitative Verknüpfung entstünde. Bei 20 °C und 50 °C wären demnach bis zu 6.8- bzw. 5.0-fache Steigerungen möglich. Aus diesen Werten ließ sich eine Ausbeute für die in Abbildung 32c dargestellte Verknüpfungsreaktion bei 50 °C berechnen. Dazu wurde das Verhältnis  $F_{585}/F_{523}$  der Sonden **136** + **145** vor der Templatzugabe als Minimalwert (0%) gesetzt (Abbildung 34b). Die benachbarte Hybridisierung der Sonden bewirkte eine 13%ige Steigerung des FRET-Signals, welches nach einstündiger Reaktion auf 47% des Maximalwerts anstieg. Unter Berücksichtigung des aus dem ternären Komplex stammenden Anteils ergab sich eine Reaktionsausbeute von 39%. Dieser Wert schien für eine templatgesteuerte Verknüpfung relativ niedrig. Allerdings wurden deutlich verminderte Ausbeuten für fluorogene templatvermittelte PNA-Verknüpfungen (ca. 50%) im Vergleich zu den nicht fluorogenen Varianten (70–95%) schon von Dose beobachtet.<sup>[246]</sup> Möglicherweise spielen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Farbstoffmoleküle dabei eine Rolle, welche die Verfügbarkeit der PNA-Konjugate für templatgesteuerte Reaktionen verringern könnten.



**Abbildung 34:** a) Relative Änderung des FRET-Signals durch die Ausbildung des nicht zur Reaktion befähigten ternären Komplexes **147•145•Raf-mt2** und des Produktduplexes **148•Raf-mt2**. b) FRET-Signale der reaktiven Sonden **136** + **145** vor Zugabe des Templats Raf-mt2, des ternären Komplexes **147•145•Raf-mt2**, nach 1 h Reaktion (**136** + **145**) in Gegenwart von Raf-mt2 und des Produktduplexes **148•Raf-mt2**, sowie relative Anteile am Signalanstieg in % ( $T = 50\text{ °C}$ ).

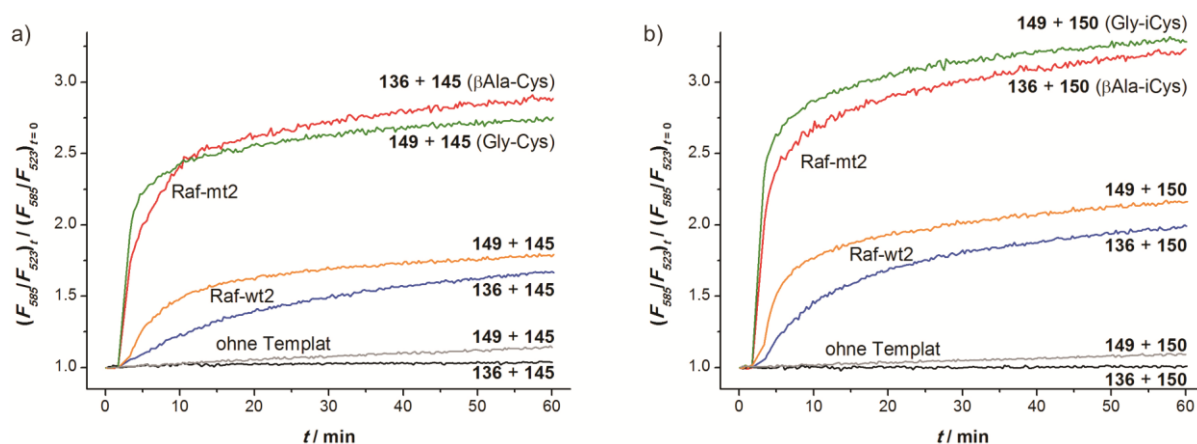
### 4.2.13 Einfluss der Reaktivitäten der Thioesterkomponente und der 1,2-Amino-thioleinheit auf die Geschwindigkeit der PNA-Verknüpfung

Mit dem Ziel, den Einfluss der Thioester- und Aminothiol-Reaktivitäten auf die templatgesteuerte Verknüpfungsreaktion zu ermitteln, wurde der PNA-Glycylthioester **149** und die Isocysteiny-PNA **150** synthetisiert (Abbildung 35a). Es musste zunächst ausgeschlossen werden, dass etwaige Unterschiede in den Signalanstiegen während der Reaktionen durch unterschiedliche FRET-Effizienzen in den verschiedenen Verknüpfungsprodukten verursacht werden. Dazu wurden ebenfalls die  $\beta$ Ala-*i*Cys-, Gly-Cys- und Gly-*i*Cys-verknüpften PNAs **151–153** analog zum  $\beta$ Ala-Cys-verknüpften Konjugat **148** hergestellt und fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert. Die bei 50 °C im Vergleich zu den anderen PNAs verringerte FAM-Emission der einzelsträngigen, Gly-*i*Cys-verknüpften PNA **153** fiel im Duplex mit dem Templat Raf-mt2 nur noch geringfügig kleiner aus (Abbildung 35b). Da auch die Templataffinitäten der PNA-Thioester und der Aminothiol-PNAs untereinander identisch waren, mussten Unterschiede in den Signalanstiegen der Ligationsreaktionen aus den verschiedenen Reaktivitäten der Sonden herrühren.



**Abbildung 35:** a) PNA- $\beta$ Ala-Thioester **136**, PNA-Gly-Thioester **149**, Cys-PNA **145** und *i*Cys-PNA **150**, sowie die entsprechenden Verknüpfungsprodukte **148** und **151–153** ( $R = (CH_2)_2SO_3H$ ). b) Fluoreszenzspektren der Verknüpfungsprodukte in Gegenwart und in Abwesenheit des komplementären Templats Raf-mt2 (1  $\mu$ M Verknüpfungsprodukt und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 50$  °C,  $\lambda_{ex} = 470$  nm).

Die Umsetzung des PNA-Glycylthioesters **149** mit der Cysteiny-PNA **145** in Gegenwart von Raf-mt2 und Raf-wt2 ergab nach 1 h Reaktionszeit vergleichbare Änderungen des FRET-Signals wie die Reaktion des PNA- $\beta$ Alanylthioesters **136** mit **145**. Dagegen generierte die templatunabhängige Reaktion des PNA-Glycylthioesters ein 3.9-fach höheres Signal als die des PNA- $\beta$ Alanylthioesters (Abbildung 36a). Die Isocysteiny-PNA **150** führte im Vergleich zur Cysteiny-PNA **145** mit beiden Thioestern und an beiden Templaten zu höheren Endwerten. Wieder erzeugte die templatunabhängige Umsetzung von **149** und **150** einen größeren Signalanstieg als die von **136** und **150** (Abbildung 36b). Auf die nach 1 h gemessenen FRET-Signale der templatgesteuerten Reaktionen hatte also die Erhöhung der Reaktivität auf der Acylseite des Thioesters keinen signifikanten Einfluss, auf die der templatunabhängigen Reaktionen hingegen schon. Dieser Befund deckte sich mit den Erkenntnissen aus den Reaktionen von PNA-MESNA und PNA-MPAA-Thioestern (vgl. Kapitel 4.2.7), bei denen die Reaktivität auf der Thiolseite der Thioester moduliert wurde. Durch den Austausch des Cysteins durch Isocystein konnte der Signalanstieg am Templat dagegen leicht erhöht werden, wobei dies auf die templatunabhängige Reaktion einen gegenteiligen Effekt hatte.

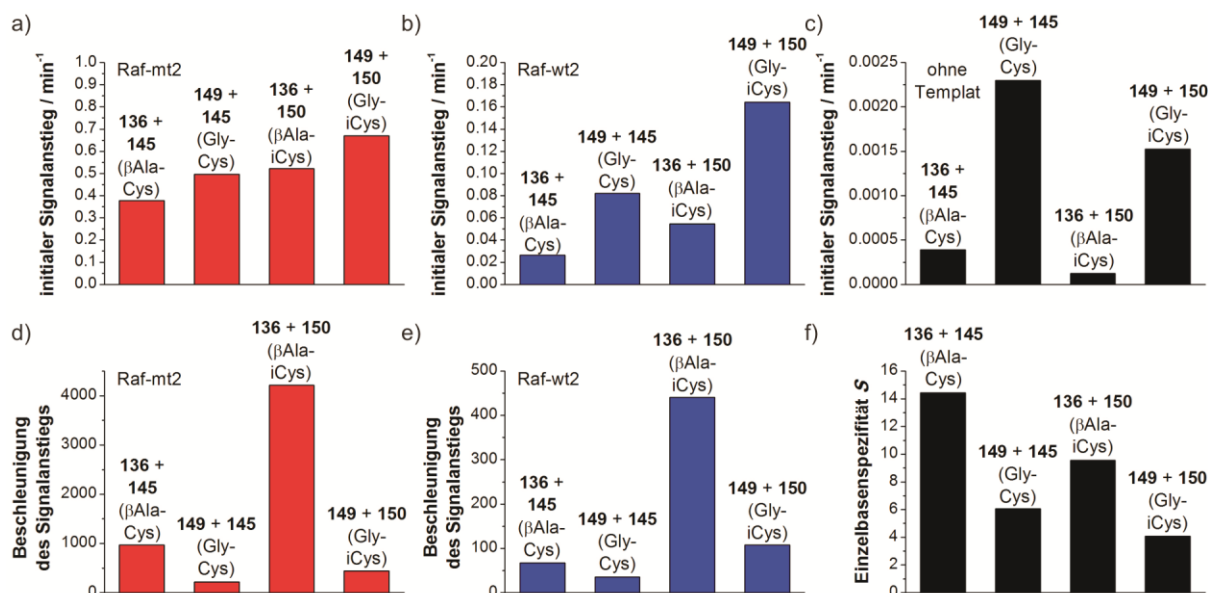


**Abbildung 36:** Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung des PNA- $\beta$ Ala-Thioesters **136** oder des PNA-Gly-Thioesters **149** mit a) Cys-PNA **145** oder b) iCys-PNA **145** in Gegenwart des komplementären Templats Raf-mt2, des einzelbasenfehlpaarenden Templats Raf-wt2 sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM MESNA, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 50^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{ nm}$ ).

Einen genaueren Einblick in die Reaktionskinetik gestattet die Betrachtung der initialen Signalanstiege (Abbildung 37a–c). Deren Reihenfolge am komplementären Templat Raf-mt2 ergab sich zu  $\beta$ Ala-Cys < Gly-Cys  $\approx$   $\beta$ Ala-iCys < Gly-iCys, wobei die Werte um nicht mehr als den Faktor 1.8 voneinander differierten. Für das einzelbasenfehlpaarende Templat Raf-wt2



## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR



**Abbildung 37:** a)–c) Anfangsgeschwindigkeit der Signalanstiege bei der Umsetzung des PNA-βAla-Thioesters **136** oder des PNA-Gly-Thioesters **149** mit der Cys-PNA **145** oder der iCys-PNA **150** a) in Gegenwart des komplementären Templats Raf-mt2, b) in Gegenwart des einzelbasenfehlpaarenden Templats Raf-wt2 sowie c) ohne Templat. d), e) Beschleunigung des initialen Signalanstiegs durch Zugabe des Templats d) Raf-mt2 oder e) Raf-wt2. f) Einzelbasenspezifitäten der templatgesteuerten Ligationen (1 μM Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4, *T* = 50 °C).

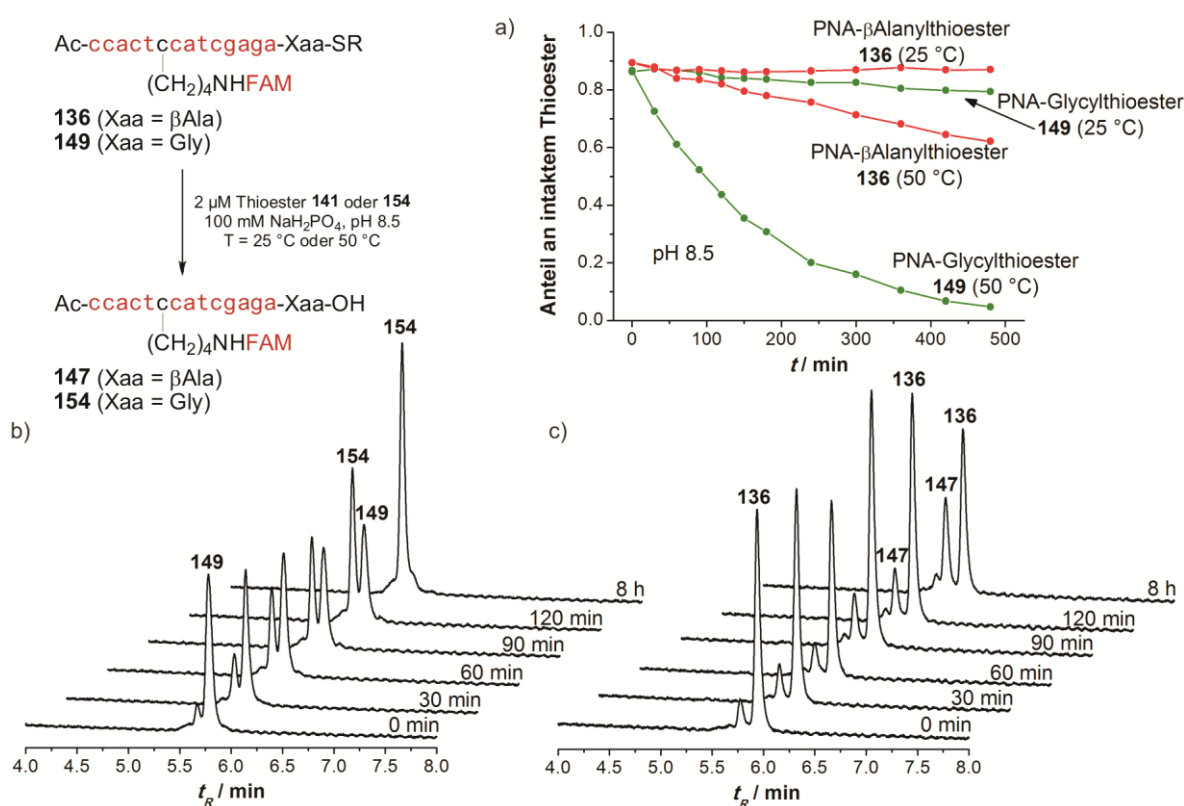
galt  $\beta\text{Ala-Cys} < \beta\text{Ala-iCys} < \text{Gly-Cys} \ll \text{Gly-iCys}$  mit bis zu 6.3-fachen Unterschieden in den Anfangsgeschwindigkeiten. Hier war der Einfluss der Reaktivitäten der involvierten funktionellen Gruppen also deutlich stärker ausgeprägt als am komplementären Templat. Eine Erklärung bot das in Kapitel 4.2.7 entwickelte Modell der geschwindigkeitsbestimmenden konformativen Umordnung im ternären Sonden-Templat-Komplex. Während diese am perfekt gepaarten Templat aufgrund der Rigidität langsam ablaufen müsste, besaß der fehlgepaarte Komplex wohl genügend Flexibilität für raschere Konformationsänderungen. Daher wurde hier der Einfluss der Reaktivität auf die Reaktionsgeschwindigkeit wieder prägnanter. Trotzdem war er noch deutlich schwächer als bei den templatunabhängigen Reaktionen, die der Reihe  $\beta\text{Ala-iCys} < \beta\text{Ala-Cys} \ll \text{Gly-iCys} < \text{Gly-Cys}$  folgten und bis zu 18.5-fach in den Signalanstiegsraten variierten.

Durch Division der Werte der templatvermittelten Umsetzungen durch die der templatunabhängigen Reaktionen erhält man die Beschleunigung, die der Signalanstieg durch die Zugabe der jeweiligen DNA erfuhr (Abbildung 37d, e). Die βAla-iCys-Ligation besaß am komplementären Templat mit einer über 4200-fachen Beschleunigung den mit Abstand höchsten Wert. Es folgten die βAla-Cys- (971-fach), die Gly-iCys- (439-fach) und die Gly-

Cys-Ligation (216-fach). Die Reaktionen mit Beteiligung des PNA- $\beta$ Alanylthioesters **136** waren also durch eine sehr geringe Hintergrundrate bei gleichzeitig akzeptablen Signalanstiegen in Gegenwart von Raf-mt2 gekennzeichnet. Darüber hinaus erfuhren sie durch das Templat mindestens viermal höhere Beschleunigungen als die Reaktionen des PNA-Glycylthioesters **149**. Die  $\beta$ Ala-Cys-Ligation besaß die größte Einzelbasenspezifität von allen getesteten Kombinationen ( $S = 14$ , Abbildung 37f).

#### 4.2.14 Vergleich der Hydrolyseempfindlichkeit von PNA- $\beta$ Alanyl- und PNA-Glycylthioestern

Die verminderte Reaktivität des PNA- $\beta$ Alanylthioesters **136** in den templatunabhängigen Umsetzungen ließ ebenso auf eine erhöhte Hydrolyseresistenz gegenüber dem PNA-Glycylthioester **149** schließen. Diese wäre für den Einsatz in der PCR von Vorteil, bei der hohe Temperaturen die Hydrolyse elektrophiler Reaktanden beschleunigen würden. Daher wurden **136** und **149** mittels UPLC<sup>®</sup> hinsichtlich ihrer Hydrolysegeschwindigkeit untersucht (Abbildung 38). Bei pH 8.5 und 25 °C blieb der Anteil des  $\beta$ Alanylthioesters über einen



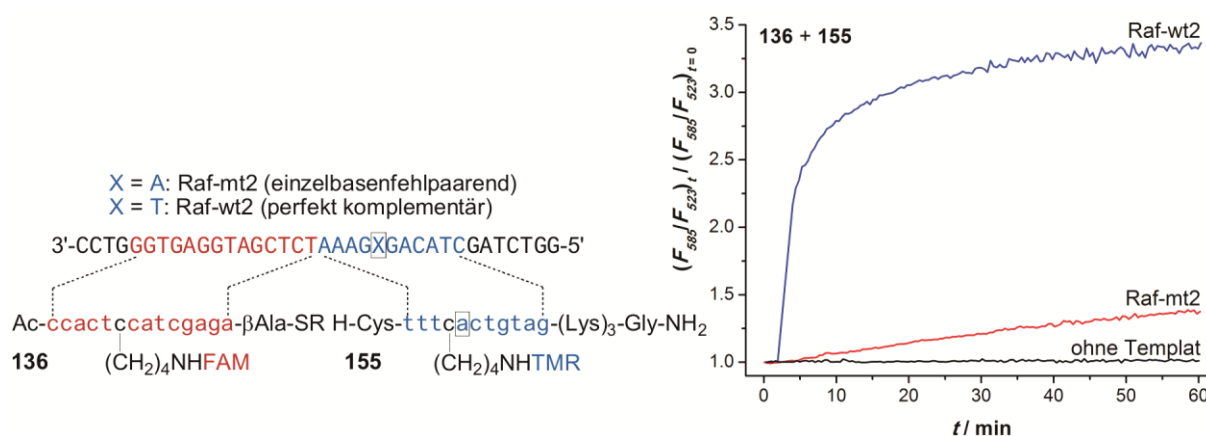
**Abbildung 38:** a) Hydrolyse des PNA- $\beta$ Ala-Thioesters **136** und des PNA-Gly-Thioesters **149** bei pH 8.5 und T = 25 °C bzw. 50 °C. b), c) UPLC<sup>®</sup>-Spuren von b) **149** und c) **136** nach verschiedenen Inkubationszeiten bei T = 50 °C (2  $\mu$ M PNA-Thioester, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5, UPLC<sup>®</sup>: Gradient 11,  $\lambda$  = 260 nm).



Zeitraum von 8 h nahezu unverändert, während 7% des Glycylthioester in die freie Säure **154** überführt wurden. Bei einer Temperatur von 50 °C waren die Unterschiede wesentlich stärker ausgeprägt. So lag nach 2 h nur noch die Hälfte des Glycylthioesters vor, während selbst nach 8 h noch mehr als 60% des  $\beta$ Alanylthioesters intakt waren. Unter diesen Bedingungen verlief die Hydrolyse von **136** 5.5-fach langsamer als die von **149**. Die Temperaturerhöhung beschleunigte die Umsetzung von **149** also deutlich, wohingegen **136** besonders während der ersten 2 h davon nur unwesentlich beeinflusst wurde. Die hohe Hydrolyseresistenz bei erhöhten Temperaturen, die niedrige Hintergrundrate in der templatunabhängigen Verknüpfung und die hohe Geschwindigkeit der templatgesteuerten Ligation empfahlen den PNA- $\beta$ Alanylthioester **136** für einen Einsatz in der PCR.

#### 4.2.15 Detektion des Wildtyptemplats

Da die  $\beta$ Ala-Cys-Verknüpfung gegenüber der  $\beta$ Ala-*i*Cys-Ligation die größere Einzelbasenspezifität besaß, wurde sie für weitere Untersuchungen ausgewählt. Um auch die Wildtypvariante des B-Raf-Gensegments detektieren zu können, erfolgte die Synthese der TMR-markierten Cysteinyl-PNA **155**. Diese bindet spezifisch an das Wildtyptemplat Raf-wt2 und bildet mit Raf-mt2 eine Einzelbasenfehlpaarung aus. Die Umsetzung von **155** mit dem PNA- $\beta$ Alanylthioester **136** unter den Bedingungen der templatgesteuerten NCL lieferte in Gegenwart des komplementären Templats Raf-wt2 nach 1 h einen 3.4-fachen Signalanstieg (Abbildung 39). Das fehlpaarende Templat Raf-mt2 bewirkte in der gleichen Zeit nur einen 1.4-fachen Anstieg des FRET-Signals, während die Hintergrundreaktion kaum zu detektieren



**Abbildung 39:** Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung des PNA- $\beta$ Ala-Thioesters **136** mit der wildtypspezifischen Cys-PNA **155** in Gegenwart des komplementären Templats Raf-wt2, des einzelbasenfehlpaarenden Templats Raf-mt2 sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden und DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4,  $T = 50$  °C,  $\lambda_{\text{ex.}} = 470$  nm, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H).

war. Die Einzelbasenspezifität der Verknüpfung war mit  $S = 68$  mehr als fünfmal größer als die entsprechende Reaktion von **136** mit der mutantenspezifischen Sonde **145** ( $S = 14$ ). Eine Schmelzkurvenanalyse der perfekt gepaarten und einzelbasenfehlgepaarten Duplexe **155**•Raf-wt2 und **155**•Raf-mt2 ergab einen Unterschied in den Schmelztemperaturen von lediglich  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_M = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw.  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die über Denaturierungsexperimente ermittelten Templataffinitäten konnten daher nicht für eine Erklärung der gesteigerten Einzelbasenspezifität herangezogen werden.

#### 4.2.16 Kompatibilität der PCR mit dem Thioladditiv MESNa und den reaktiven PNA-Konjugaten

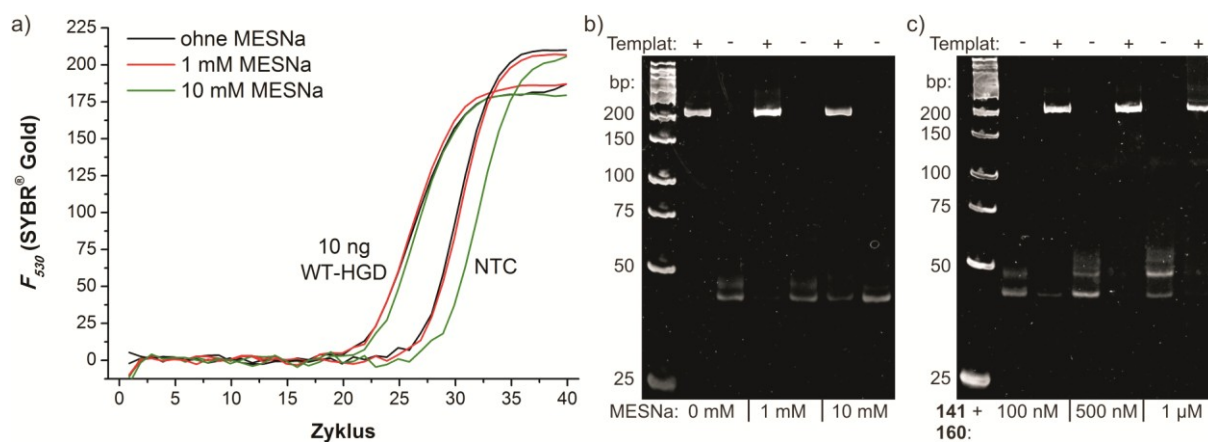
Mit dem PNA- $\beta$ Alanylthioester **136** und den Cysteinyl-PNAs **145** und **155** standen zwei Sätze genotypspezifischer Sonden für den Einsatz in der PCR zur Verfügung. Um dem Szenario einer Genotypisierung von DNA aus menschlichen Gewebeproben über eine templatgesteuerte Verknüpfungsreaktion möglichst nahe zu kommen, wurde humane, genomische DNA als Ausgangsmaterial für die PCR ausgewählt. Die Wildtyp-DNA (WT-HGD) wurde aus menschlichem Blut gewonnen und von *Roche* bezogen. Die einzelbasenmutierte DNA (MT-MEL) stammte aus der menschlichen Melanomzelllinie SK-MEL-28, die homzygot für die V600E-Mutation des B-Raf-Gens ist, und wurde von der *American Type Culture Collection (ATCC)* erworben. Zuerst galt es, entsprechende Primer zu finden, welche die Zielsequenz mit den Anbindungsstellen der PNA-Sonden vervielfältigen und dabei für eine Anlagerungs- bzw. Reaktionstemperatur von  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  geeignet sind. Kumar *et al.* verwendeten einen Primersatz, der bei einer Anlagerungstemperatur von  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  das gewünschte Amplicon aus dem Exon 15 des B-Raf-Gens lieferte.<sup>[236]</sup> Durch Kürzung um jeweils ein Nukleotid ergeben sich die Sequenzen des Vorwärtsprimers **1** (VP1) und des Rückwärtsprimers **1** (RP1), die ein 208 Basenpaare langes Amplicon vervielfältigen (Abbildung 40). Außerdem wurde ein zweiter Vorwärtsprimer (VP2) gewählt, der näher an



**Abbildung 40:** a) Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer VP1, VP2 und RP1. b) Ausschnitt aus dem humanen B-Raf-Gen. Die Position der V600E(T1799A)-Einzelbasenmutation (X) befindet sich im Exon 15 (in eckigen Klammern eingefasst). Die Anbindungsstellen der Cys-PNAs **145** bzw. **155** (blau), des PNA- $\beta$ Ala-Thioesters **136** (rot), der Vorwärtsprimer (orange) und des Rückwärtsprimers (grün) sind farbig markiert.

der Anbindungsstelle der Cysteinyl-PNA hybridisiert und so mit RP1 ein kürzeres, 108 Basenpaare langes Amplicon erzeugt.

Zuerst wurde getestet, ob die PCR die Anwesenheit des Thioladditivs MESNa toleriert. Dieses wird benötigt, um als Reduktionsmittel die Bildung von Disulfiden der Cysteinyl-PNAs zu verhindern. Das Temperaturprogramm der PCR begann mit der Denaturierung des doppelsträngigen Templats bei 95 °C (10 s), gefolgt von der Anlagerung der Primer bei 50 °C (20 s) und deren Elongation durch die Polymerase bei 72 °C (20 s). Diese drei Schritte wurden jeweils vierzigmal wiederholt. Der zugesetzte Interkalatorfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Gold sollte durch einen Fluoreszenzanstieg die Bildung der doppelsträngigen PCR-Produkte anzeigen. Die PCR wurde mit 10 ng des Wildtypemplats WT-HGD und mit unterschiedlichen Konzentrationen an MESNa angesetzt. Zur Kontrolle erfolgte jedes Experiment auch in Abwesenheit des Templats (*no template control*, NTC). Der im Anlagerungsschritt eines jeden PCR-Zyklus detektierte Anstieg der SYBR<sup>®</sup> Gold-Emission bei 530 nm wurde durch die Anwesenheit von 1 mM oder 10 mM des Thioladditivs nicht beeinflusst (Abbildung 41a). Zudem bestätigte eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Lösungen nach der Amplifizierung die Bildung der erwarteten Amplicons in den templatenthaltenden Ansätzen (Abbildung 41b). Die PCR war demnach mit den getesteten MESNa-Konzentrationen kompatibel. Im Falle der NTCs lag in den Gelen keine dem Amplicon entsprechende Bande



**Abbildung 41:** a) SYBR<sup>®</sup> Gold-Fluoreszenz während der PCR in Gegenwart von verschiedenen MESNa-Konzentrationen. b) Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Lösungen aus a). c) Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Lösungen aus Amplifizierungsreaktionen in Gegenwart von 10 mM MESNa und verschiedenen Konzentrationen der reaktiven PNA-Konjugate **136 + 155** (PCR-Bedingungen: 100 nM VP1, 100 nM RP1, 200 µM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM TRIS, pH 8.5 (bei 25 °C), 1 u *Taq*-Polymerase, ggf. 10 ng Templat WT-HGD, PCR-Protokoll: 10 s 95 °C, 20 s 50 °C (Detektion:  $\lambda_{ex.} = 490$  nm,  $\lambda_{em.} = 530$  nm), 20 s 72 °C, Gel: 8% Polyacrylamid, Anfärbung: SYBR<sup>®</sup> Gold, bp = Basenpaare).

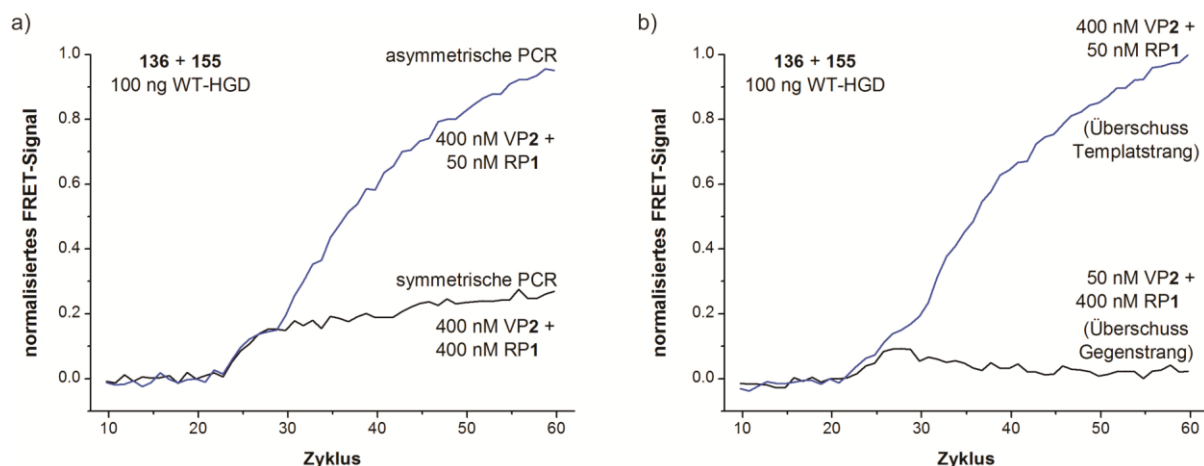
vor. Hier wurden jedoch Produkte mit einer Länge  $< 50$  Basenpaare detektiert, welche ebenfalls zu einem Anstieg der SYBR<sup>®</sup> Gold-Fluoreszenz in späteren PCR-Zyklen führten. Diese wurden sogenannten Primerdimeren<sup>[247]</sup> zugeordnet, die aufgrund der relativ niedrigen Anlagerungstemperatur gebildet werden können und ungefähr die doppelte Länge der einzelnen Primer aufweisen. Sie entstehen durch die Hybridisierung zweier Primer an deren jeweiligen 3'-Enden und die anschließende Verlängerung durch die Polymerase. Die bevorzugte Bildung der Primerdimere in Abwesenheit des Templats kann durch die freie Verfügbarkeit der einzelnen Primer erklärt werden, die hier nicht in die Templatamplifizierung involviert waren. In den Fluoreszenzmessungen wurde der Nachteil einer unspezifischen Echtzeitdetektion der PCR-Produkte deutlich. Der Interkalatorfarbstoff ist nicht in der Lage, zwischen dem Amplicon und den Primerdimeren zu unterscheiden.

Um auszuschließen, dass die reaktiven PNA-Konjugate eine Inhibierung der PCR bewirken, wurde eine weitere Amplifizierung in Gegenwart von 10 mM MESNa und verschiedenen Konzentrationen des FAM-markierten PNA- $\beta$ Alanylthioesters **136** und der TMR-markierte Cysteinyl-PNA **155** durchgeführt. Auch hier belegte die gelelektrophoretische Analyse die effiziente Amplifizierung des Amplicons bei Sondenkonzentrationen von bis zu 1  $\mu$ M (Abbildung 41c).

### 4.2.17 Detektion der templatgesteuerten Verknüpfungsreaktion während der PCR

Anschließend wurde die Reaktion des PNA-Thioesters **136** mit der Cysteinyl-PNA **155** während der Amplifizierung des komplementären Templats WT-HGD mittels Fluorometrie verfolgt. Dazu wurden die Sonden in einer Konzentration von 200 nM dem PCR-Mix zugesetzt und der FAM-Fluorophor in jedem Primer- und Sondenanlagerungsschritt bei 490 nm bzw. 485 nm angeregt. Das Auslesen der FAM- und TMR-Emissionen erfolgte bei 530 nm bzw. 585 nm. Durch Bildung des Quotienten ( $F_{585}/F_{530}$ ) in jedem Zyklus, Teilung des Werts durch den aus Zyklus 20 (hier ist die Menge des gebildeten PCR-Produkts noch sehr gering) und anschließende Normalisierung wurde eine im Folgenden als normalisiertes FRET-Signal bezeichnete Größe erhalten. Nach einem anfänglichen, leichten Anstieg ab dem 23. Zyklus erreichte dieses schnell ein Plateau bei niedriger Intensität, wenn äquimolare Mengen der Primer zugegen waren (Abbildung 42a). Es wurde spekuliert, dass die relativ kurzen Sonden nur bei niedrigen Konzentrationen des PCR-Produkts (bis Zyklus 28) an dieses binden konnten. Bei höheren Konzentrationen (ab Zyklus 29) verhinderte womöglich die schnelle Rückbildung des Templatdoppelstrangs eine benachbarte Hybridisierung. Einen

## 4.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfung während der PCR

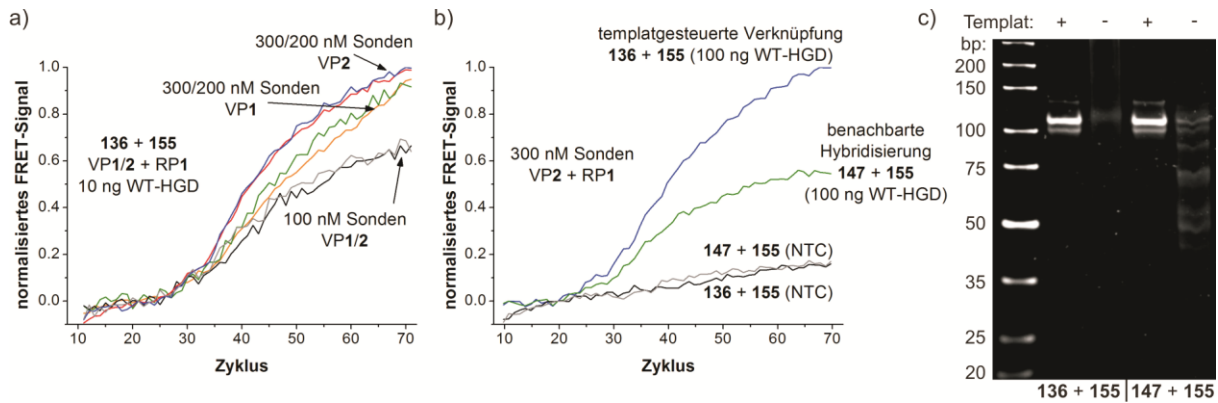


**Abbildung 42:** Normalisiertes FRET-Signal für die Verknüpfung des PNA-Thioesters **136** mit der Cys-PNA **155** während der PCR. a) Symmetrische PCR (je 400 nM VP2 und RP1) oder asymmetrische PCR (400 nM VP2, 50 nM RP1). b) Überschuss des Vorwärtsprimers VP2 oder des Rückwärtsprimers RP1 (PCR-Bedingungen: 200 nM Sonden, 100 ng Templat WT-HGD, 200  $\mu$ M dNTPs, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM MESNa, 10 mM TRIS, pH 8.5 (bei 25 °C), 1 u *Taq*-Polymerase, PCR-Protokoll: 10 s 95 °C, 30 s 50 °C (Detektion:  $\lambda_{ex}$  = 490 nm bzw. 485 nm (FAM),  $\lambda_{em}$  = 530 nm (FAM), 585 nm (TMR)), 20 s 72 °C).

Ausweg bot die Verwendung eines großen Überschusses des Vorwärtsprimers, dessen Verlängerung zur Synthese des Templatstrangs führt. Unter diesen Bedingungen wird nach einer frühen, exponentiellen Amplifizierungsphase der Templatstrang linear vervielfältigt, nachdem der Rückwärtsprimer aufgebraucht ist (asymmetrische PCR).<sup>[248]</sup> So kann ein Überschuss an einzelsträngigem Templat generiert werden, was bei Hybridisierungssonden wie den *molecular beacons*<sup>[249]</sup> oder kürzlich auch bei templatgesteuerten Wittig-Reaktionen an PCR-Produkten<sup>[193]</sup> zu erhöhten Signalanstiegen führte. Die Verringerung der Konzentration von RP1 auf ein Achtel der Konzentration von VP2 führte in der Tat zu einem FRET-Signal, welches auch in späteren PCR-Zyklen stetig anstieg (Abbildung 42a). Bei einem umgekehrten molaren Verhältnis der Primer fiel das Signal nach einem anfänglichen Anstieg sogar wieder ab (Abbildung 42b). Dies belegte die Notwendigkeit eines Überschusses des Zielstrangs, um eine erfolgreiche Anlagerung der reaktiven PNA-Sonden zu gewährleisten.

Die Variation der Sondenkonzentration sowie des Vorwärtsprimers führte für Konzentrationen von 200–300 nM und bei Verwendung von VP2 an Stelle von VP1 zu leicht verbesserten Signalanstiegen (Abbildung 43a). VP2 bindet nahe der kürzeren Cysteinyl-PNA am Templat und kann dieser den Zugang zum PCR-Produkt durch eine Verlangsamung der Rehybridisierung im Anlagerungsschritt der PCR erleichtern.<sup>[173]</sup> Um zu klären, ob der detektierte Anstieg des FRET-Signals tatsächlich von einer templatvermittelten Verknüpfungsreaktion verursacht

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



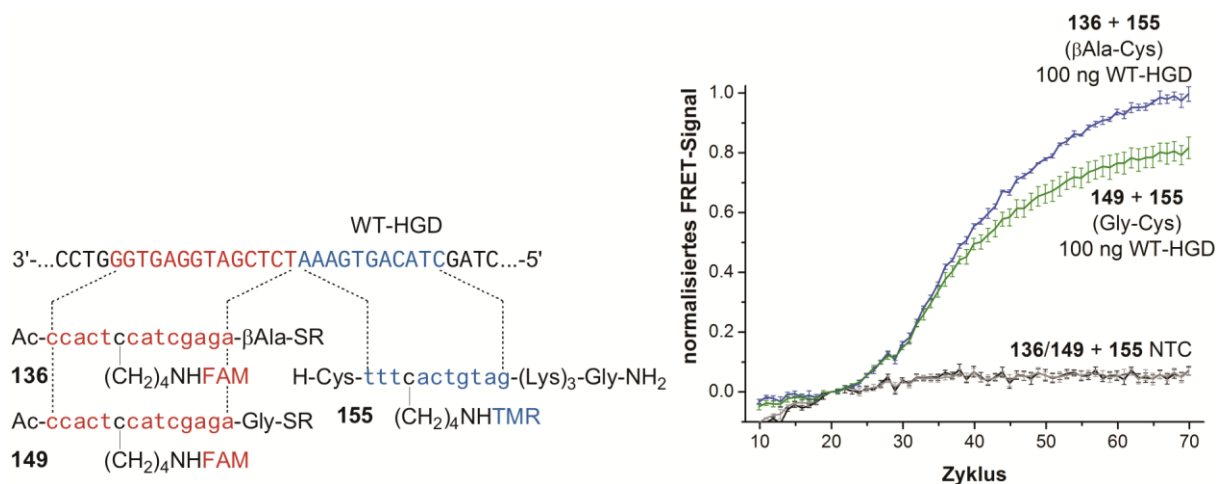
**Abbildung 43:** a) Normalisiertes FRET-Signal für die PNA-Verknüpfung während der PCR mit verschiedenen Konzentrationen des PNA-Thioesters **136** und der Cys-PNA **155** sowie verschiedenen Vorwärtsprimern (VP1 bzw. VP2). b) Signalanstieg in Anwesenheit des reaktiven Sondenpaars **136 + 155** bzw. des nicht reaktiven Sondenpaars **147** (hydrolysiertes **136**) + **155**. c) Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Lösungen aus b) (PCR-Bedingungen: 100–300 nM Sonden, ggf. 10–100 ng Templat WT-HGD, 400 nM VP1 bzw. VP2, 50 nM RP1, 200 µM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MESNa, 10 mM TRIS, pH 8.5 (bei 25 °C), 1 u *Taq*-Polymerase, PCR-Protokoll: 10 s 95 °C, 30 s 50 °C (Detektion:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 490 nm bzw. 485 nm (FAM),  $\lambda_{\text{em}}$  = 530 nm (FAM), 585 nm (TMR)), 20 s 72 °C, Gel: 8% Polyacrylamid, Anfärbung: SYBR® Gold, bp = Basenpaare).

wurde, erfolgte ein Kontrollexperiment mit der nicht reaktiven, FAM-markierten PNA-Carbonsäure **147** (hydrolysiertes **136**). Auch hier könnte eine benachbarte Hybridisierung mit der TMR-markierten Cysteiny-PNA **155** einen FRET induzieren. Der Signalanstieg war jedoch nach 70 Zyklen nur ungefähr halb so groß wie im Falle des zur Verknüpfung befähigten Sondenpaars **136 + 155** (Abbildung 43b). Wie die gelelektrophoretische Analyse belegte, wurde das 108 Basenpaare lange Amplicon in beiden Amplifizierungsreaktionen in vergleichbaren Mengen gebildet (Abbildung 43c). Daher musste der höhere Signalanstieg für das Paar **136 + 155** durch die templatgesteuerte Verknüpfungsreaktion verursacht worden sein. Deutlich geringere Signale für Hybridisierungssonden wurden schon zuvor in den Experimenten mit synthetischen DNA-Templaten beobachtet (vgl. Abbildung 32c). Während dort ein zeitlich konstantes Signal erzeugt wurde, stieg es hier im Laufe der PCR an, da es fortwährend zur Bildung von neuen Templatmolekülen kam. Bemerkenswerterweise war der in Abwesenheit des Templats (NTC) durch das reaktive Sondenpaar verursachte Signalanstieg nicht höher als der durch die Hybridisierungssonden ausgelöste. Somit kann die templatunabhängige Hintergrundreaktion bei den gewählten Sondenkonzentrationen vernachlässigt werden.



4.2.18 Vergleich der  $\beta$ Ala-Cys-Ligation mit der Gly-Cys-Ligation während der PCR

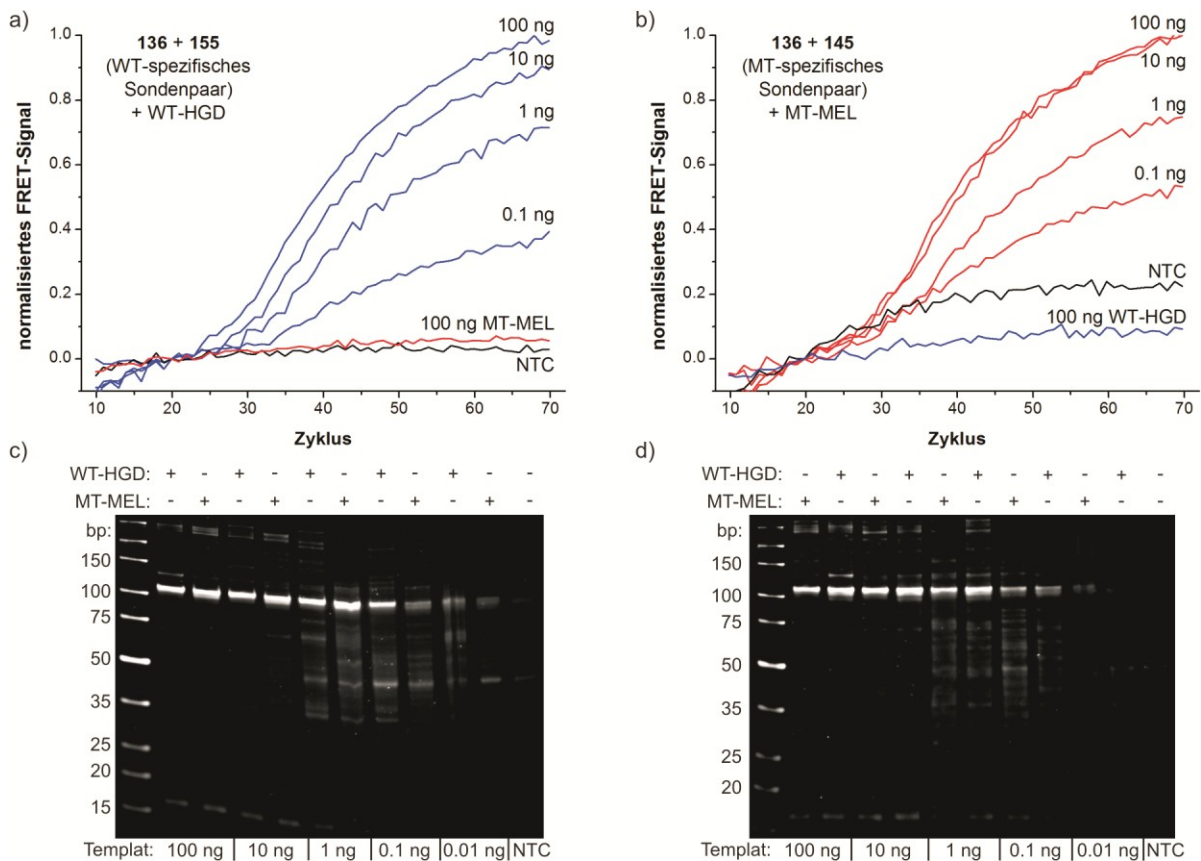
Die Untersuchungen über die Hydrolyseempfindlichkeiten der PNA-Thioester legten die Vermutung nahe, dass der hydrolyseresistentere PNA- $\beta$ Alanylthioester **136** gegenüber dem PNA-Glycylthioester **149** besser für eine Verknüpfungsreaktion während der PCR geeignet ist. Eine PCR in Gegenwart des Templats WT-HGD und der PNA-Konjugate **136** und **155** ergab tatsächlich einen höheren Signalanstieg als eine PCR mit dem Glycylthioester **149** und **155** (Abbildung 44). Der Unterschied wurde jedoch erst nach 35–40 Zyklen signifikant und betrug nach 70 Zyklen ca. 20%. Besonders in den späten Zyklen wird der Anteil an intaktem  $\beta$ Alanylthioester **136** höher sein und damit ein größerer Anteil des generierten Signals auf die templatvermittelte Reaktion zurückgehen. Dieser liegt allerdings auf dem Teil des Signals, der durch die benachbarte Hybridisierung der Sonden hervorgerufen wird und für beide Sondenpaare gleich groß sein sollte. Daher wird der durch die Reaktion von **136** mit **155** verursachte Signalanstieg tatsächlich um mehr als 20% größer sein als jener der Umsetzung von **149** mit **155**. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Hydrolyse der Thioester unter den Bedingungen der PCR generell langsamer abläuft als die in Abbildung 38 dargestellten Experimente vermuten lassen. So wird in der PCR Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) als Pufferbestandteil verwendet, dessen pH-Wert mit steigender Temperatur stark abnimmt. Dieser Effekt wirkt der beschleunigten Hydrolyse bei erhöhter Temperatur entgegen.



**Abbildung 44:** Normalisiertes FRET-Signal für die Verknüpfung des PNA- $\beta$ Ala-Thioesters **136** bzw. des PNA-Gly-Thioesters **149** mit der Cys-PNA **155** während der PCR (PCR-Bedingungen: 300 nM Sonden, ggf. 100 ng Templat WT-HGD, 400 nM VP2, 50 nM RP1, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM MESNa, 10 mM TRIS, pH 8.5 (bei 25  $^{\circ}\text{C}$ ), 1 u *Taq*-Polymerase, PCR-Protokoll: 10 s 95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s 50  $^{\circ}\text{C}$  (Detektion:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 490 nm bzw. 485 nm (FAM),  $\lambda_{\text{em}}$  = 530 nm (FAM), 585 nm (TMR)), 20 s 72  $^{\circ}\text{C}$ , Mittelwerte aus Fünffachmessungen, Fehler = 1  $\sigma$ ).

#### 4.2.19 Bestimmung der Nachweisgrenze und der Einzelbasenspezifität der PNA-Verknüpfung während der PCR

Die templatgesteuerte Verknüpfungsreaktion wurde anschließend hinsichtlich der Startmenge an genomischer DNA untersucht, die zur Generierung eines detektierbaren Signals benötigt wird. Dazu wurden PCRs mit dem PNA- $\beta$ Alanylthioester **136** und der wildtypspezifischen Cysteinyl-PNA **155** sowie immer kleineren Mengen des Wildtyptemplats WT-HGD angesetzt. Das gleiche Vorgehen erfolgte mit **136** und der mutantenspezifischen Cysteinyl-PNA **145** in Gegenwart des einzelbasenmutierten Templats MT-MEL. Zur Bestimmung der Einzelbasenspezifität der Reaktionen wurde außerdem das jeweils fehlpaarende Templat zugesetzt. Für beide Sondenpaare konnte noch ein Signal detektiert werden, wenn zu Beginn der PCR 0.1 ng



**Abbildung 45:** Normalisiertes FRET-Signal für die Verknüpfung des PNA- $\beta$ Ala-Thioesters **136** mit a) der wildtypspezifischen Cys-PNA **155** oder b) der mutantenspezifischen Cys-PNA **145** in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Wildtyp-DNA WT-HGD oder der Mutanten-DNA MT-MEL. c), d) Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Lösungen aus a) und b) (PCR-Bedingungen: 300 nM Sonden, ggf. 100–0.1 ng Templat, 400 nM VP2, 50 nM RP1, 200  $\mu$ M dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MESNa, 10 mM TRIS, pH 8.5 (bei 25 °C), 1 u Taq-Polymerase, PCR-Protokoll: 10 s 95 °C, 30 s 50 °C (Detektion:  $\lambda_{ex}$  = 490 nm bzw. 485 nm (FAM),  $\lambda_{em}$  = 530 nm (FAM), 585 nm (TMR)), 20 s 72 °C, Gel: 8% Polyacrylamid, Anfärbung: SYBR<sup>®</sup> Gold, bp = Basenpaare).



des perfekt komplementären Templat zugegen waren (Abbildung 45a, b). Diese Menge entspricht einer Anzahl von ungefähr 30 Templatmolekülen oder einer Konzentration von ca. 2.5 aM. Im Gegensatz dazu führten 1000-fach höhere Mengen an einzelbasenfehlpaarender DNA zu keinen messbaren Anstiegen. Auch in Abwesenheit der Template kam es nicht zu einer signifikanten Veränderung des FRET-Signals. Eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Lösungen zeigte die erfolgreiche Amplifizierung der Zielsequenzen für die signalerzeugenden Reaktionen an. Auch die einzelbasenfehlpaarenden Template lieferten die erwarteten PCR-Produkte (Abbildung 45c, d), sodass das Ausbleiben der Signalanstiege in deren Gegenwart auf die hohe Einzelbasenspezifität der templatgesteuerten Verknüpfungsreaktion zurückgeführt werden kann. Es ist anzumerken, dass die in Abbildung 45 dargestellten Amplifikationskurven der Templatverdünnungsreihen nicht wie typische Signalverläufe in *real-time* PCRs aussehen. Dies hat mehrere Ursachen. Zum einen wird hier das Signal durch eine chemische Reaktion generiert, welche bei hohen Sonden-Templat-Verhältnissen (in frühen PCR-Zyklen) unter *turnover* ablaufen kann. Außerdem musste durch die Bedingungen der asymmetrischen PCR eine größere Anzahl von Zyklen durchlaufen werden, um signifikante Mengen an einzelsträngiger DNA zu erhalten. Dies führte mutmaßlich zu einer verstärkten Deaktivierung der DNA-Polymerase sowie zur vermehrten Hydrolyse der dNTPs und der PNA-Thioester. Dadurch würde der Signalanstieg für geringere Templatkonzentrationen abnehmen, da die Menge an generiertem PCR-Produkt und die Ausbeute an Verknüpfungsprodukt in späteren PCR-Zyklen geringer wären.

### 4.2.20 Diskussion

Die hier beschriebene native chemische PNA-Verknüpfung stellt die erste chemische Reaktion dar, die während einer Polymerasekettenreaktion abläuft. Dabei wird sie direkt durch das *in situ* gebildete PCR-Produkt ausgelöst und kann in Echtzeit mittels Fluorometrie ausgelesen werden. Die hohe Chemo Selektivität der NCL-basierten Verknüpfungschemie ermöglichte es der Reaktion, in Anwesenheit von Proteinen und Oligonukleotiden sowie von reaktiven dNTPs stattzufinden. Durch asymmetrische PCR-Bedingungen konnte ein Überschuss des einzelsträngigen Templatstrangs erzeugt werden, welcher für die reaktiven PNA-Sonden in den Anlagerungsschritten der PCR zugänglich war. Dies gestattete die Adressierung von DNA in ihrer natürlichen, doppelsträngigen Form, was bisher für templatgesteuerte Reaktionen in einem homogenen Format nur sehr selten gelang.<sup>[173,193]</sup> Die Einschränkung in der Wahl der Zielsequenz durch die Notwendigkeit von Hoogsteen-Basenpaarungen zur Triplexbildung entfällt dabei.<sup>[138,216]</sup>

Durch die verminderte Reaktivität der PNA- $\beta$ Alanylthioester wurde eine verstärkte Hydrolyseresistenz bei erhöhten Temperaturen erreicht, was sich günstig auf die Stabilität der PNA-Konjugate unter den Bedingungen der PCR auswirkte. Die templatkontrollierte Reaktion wurde durch die Reaktivitätsminderung nicht beeinträchtigt, denn die nahtlose, benachbarte Hybridisierung der reaktiven Sonden am Templat gewährleistete eine hohe effektive Molarität der Reaktionspartner. Die für templatvermittelte Reaktionen charakteristische Produktinhibierung konnte durch die enzymatische Vervielfältigung des Templates umgangen werden, was die Detektion von attomolaren Mengen an genomischen DNA-Templates ermöglichte. Die Nachweisgrenze war um etliche Größenordnungen niedriger als für bisher beschriebene templatgesteuerte Reaktionen. Außerdem war die Verknüpfungsreaktion durch eine exzellente Einzelbasenspezifität gekennzeichnet. Nachteilig ist der erhebliche Optimierungsaufwand, der für das Auffinden von geeigneten PNA-Konjugaten notwendig war. So müsste für jede neue Zielsequenz eine Anpassung der Architektur des ternären Komplexes, der Sondenlängen und des Fluorophorabstands vorgenommen werden. Dessen ungeachtet könnte die Kombination von DNA-templatvermittelten Reaktionen mit der PCR einen generellen Ansatz zur Umgehung der Produktinhibierung in nukleinsäurekontrollierten Umsetzungen darstellen.

Die während der PCR ablaufende PNA-Verknüpfungsreaktion generiert Verbindungen, die zwei Funktionalitäten in einem Molekül vereinen. Damit eröffnen sich Möglichkeiten für die sequenzprogrammierte Synthese von polyfunktionalisierten Verbindungen. Deren Aufbau könnte durch natürlich vorkommende DNA gesteuert werden, die üblicherweise nur in sehr geringen Mengen vorliegt. So wäre beispielsweise die Diversifizierung von DNA-Bibliotheken durch templatkontrollierte Chemie während SELEX-Prozeduren denkbar.

### 4.3 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen

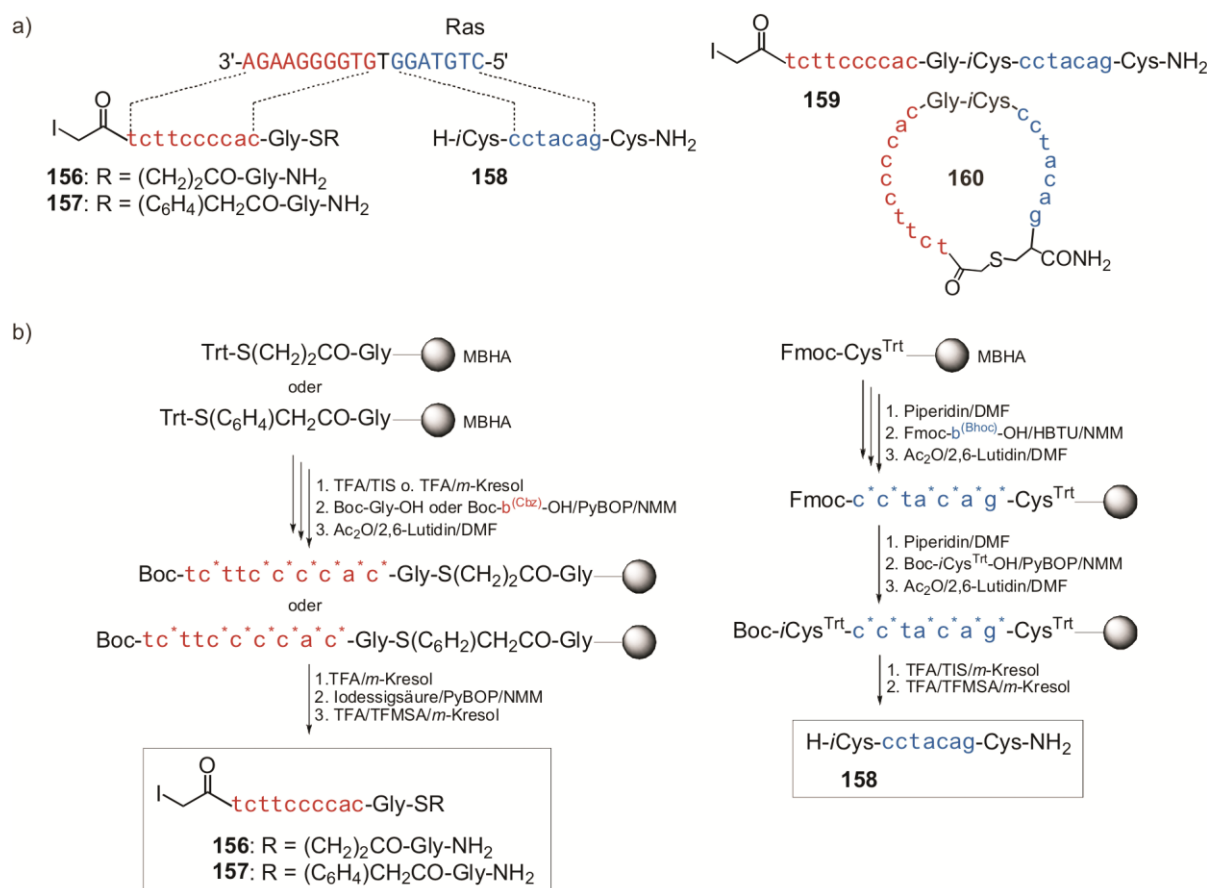
Im vorangegangenen Kapitel wurde dargelegt, wie die Umgehung der Produktinhibierung in templatgesteuerten Verknüpfungsreaktionen zu sehr niedrigen Nachweisgrenzen für das Nukleinsäuretemplat führte. Allerdings beruhte dieser Ansatz nicht auf einer Steigerung des *turnovers* der zugrunde liegenden chemischen Reaktion. Vielmehr wurde die Konzentration des Templates durch dessen enzymatische Vervielfältigung während der PCR erhöht. Eine alternative Möglichkeit, die Empfindlichkeit templatvermittelter Ligationsreaktionen zu steigern, ohne dabei auf enzymatische Reaktionen angewiesen zu sein, liegt in der

Verminderung der Produktinhibierung. Dabei ist die Reduzierung der Templataffinität der gebildeten Verknüpfungsprodukte essenziell. Diese können dann leichter durch frische Reaktanden vom Templat verdrängt werden und so dessen katalytische Aktivität steigern. Bisherige Ansätze beruhten auf einer Erhöhung der Flexibilität an der Verknüpfungsstelle, die zu lokalen Störungen der Wechselwirkung zwischen dem Ligationprodukt und dem Templat führten. Durch die Implementierung von flexiblen Linkern,<sup>[148,149,164,175]</sup> und ungepaarten Templatbasen,<sup>[115,116,164,175]</sup> durch welche die kooperative Basenstapelwechselwirkung im Duplex unterbrochen wird, konnten die Produkt-Templat-Komplexe destabilisiert werden. Eine umfassendere Destabilisierung wäre bei einer globalen Änderung in der Struktur des Verknüpfungsprodukts zu erwarten. Zyklisierungen von kurzen PNA-Konjugaten führten bei geeigneter Wahl der Zyklisierungslinker zu einem deutlichen Verlust der Bindungsaffinität gegenüber komplementären DNAs.<sup>[250,251]</sup> Demnach hätte eine templatgesteuerte PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion das Potential zur Generierung von Produkten mit signifikant verminderten Templataffinitäten.

#### 4.3.1 Synthese von bis-funktionalisierten PNA-Konjugaten für Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen

Als Templat für die angestrebte Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion wurde die G12V-Variante des H-Ras-Gensegments vom Wildschwein ausgewählt. In diesem Sequenzkontext hatte die Einführung einer ungepaarten Templatbase keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit an komplementärer DNA.<sup>[171]</sup> Außerdem war bekannt, dass ein ihr gegenüberliegendes Gly-*i*Cys-Dipeptid im Verknüpfungsprodukt eine zusätzliche Verminderung der Templataffinität hervorruft.<sup>[175]</sup> Aufbauend auf der nativen chemischen PNA-Verknüpfung der PNA-Glycylthioester **156** bzw. **157** mit der Isocysteiny-PNA **158** war geplant, das lineare Produkt **159** durch eine Verknüpfung der beiden Termini in das zyklische Produkt **160** zu überführen (Abbildung 46a). Für diesen Schritt war eine Thiol→Halogenid-Substitution vorgesehen, da dieser Reaktionstyp bereits für die Verknüpfung von DNA-Konjugaten<sup>[10,151,152,154,155,217,252]</sup> und die Herstellung von makrozyklischen DNAs<sup>[151,152,154,217]</sup> eingesetzt wurde. Der Zyklisierungslinker in **160** musste für eine geringe Templataffinität möglichst kurz sein.<sup>[250]</sup> Dies schien besonders wichtig, da für zyklische PNAs, die über lange Linker verknüpft waren, sogar über eine Zunahme der Stabilität von PNA•DNA-Duplexen berichtet wurde.<sup>[253]</sup>

Zur Vermeidung von intramolekularen Reaktionen der Sonden wurden bis-nukleophile und bis-elektrophile PNA-Konjugate verwendet. Die Synthese des N-terminal iodacetylierten PNA-Thioesters **156** erfolgte an mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz unter Verwendung von Boc/Cbz-geschützten PNA-Monomeren (Abbildung 46b). Nach dem Aufbau der PNA-Sequenz wurde der N-Terminus durch Kupplung von Iodessigsäure funktionalisiert. Die TFA/TFMSA-vermittelte Freisetzung von der festen Phase und die anschließende chromatografische Reinigung ergab **156** mit 29% Ausbeute. Die am C-Terminus thiofunktionalisierte Isocysteiny-PNA **158** wurde durch automatisierte Festphasensynthese hergestellt. Dazu wurden mit Fmoc-Cys<sup>Trt</sup>-OH beladenes MBHA-Harz und Fmoc/Bhoc-geschützte PNA-Monomeren verwendet. Nach finaler Kupplung von Boc-*i*Cys<sup>Trt</sup>-OH und Abspaltung vom Harz wurde **158** nach chromatografischer Reinigung mit 20% Ausbeute erhalten (Abbildung 46c).



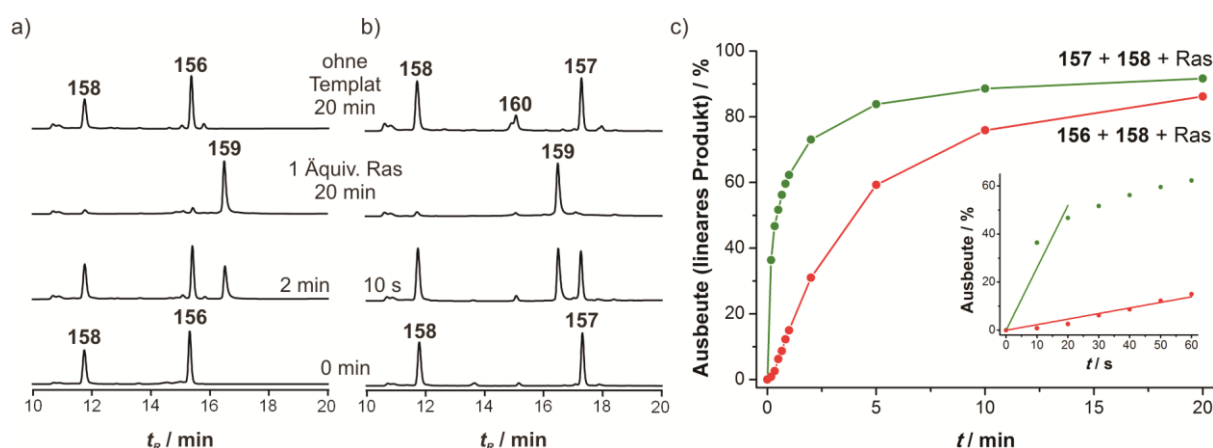
**Abbildung 46:** a) Die iodacetylierten PNA-Gly-Mercaptopropionsäure- (**156**) bzw. -Mercaptophenylacetat- (**157**) hybridisieren am Ras-Templat unter Ausbildung einer ungepaarten Templatbase neben der bis-Thiol-PNA **158**. Das lineare Verknüpfungsprodukt **159** bildet den PNA-Zyklus **160**. b) Syntheschema für die bis-funktionalisierten PNA-Sonden. Die exozyklischen Aminogruppen der mit \* gekennzeichneten Nukleobasen tragen Cbz- bzw. Bhoc-Schutzgruppen.

In den vorangegangenen Versuchen zur nativen chemischen PNA-Verknüpfung kamen meistens MESNA-Thioester zum Einsatz. MESNa wurde auch als Reduktionsmittel im Ligationspuffer verwendet, um die Entstehung von Disulfiden zu vermeiden. Eine Umthioesterung des iodacetylierten Mercaptopropionsäurethioesters **156** in MESNa-Puffer würde jedoch auch eine Substitution des N-terminalen Iods durch das Thiol zur Folge haben. Um trotzdem einen alternativen Thioester einsetzen zu können, wurde der hochreaktive PNA-Mercaptophenyllessigsäurethioester **157** mittels Festphasensynthese dargestellt (Abbildung 46b). Die bereits in der Literatur beschriebene Synthese von Peptidyl-Mercaptophenyl-lessigsäurethioestern<sup>[254]</sup> wurde für die Herstellung des entsprechenden PNA-Konjugats adaptiert. Hierzu erfolgte zuerst eine Funktionalisierung des MBHA-Harzes mit *S*-Trt-4-Mercaptophenyllessigsäure, auf deren deblockiertes Thiol anschließend Boc-Gly-OH und nach Abspaltung der Boc-Gruppe das erste PNA-Monomer gekuppelt wurde. Bei der Synthese der Peptidylthioester trat während der Kupplung der zweiten Aminosäure durch die hohe Reaktivität des Arylthioesters vermehrte Diketopiperazinbildung auf.<sup>[254]</sup> Da bei der Synthese von **157** ein PNA-Monomer gekuppelt wurde, stellte die intramolekulare Zyklisierung aufgrund der unvorteilhaften Ringgröße kein Problem dar. Der darauffolgende Aufbau der PNA-Sequenz und die abschließende Iodacetylierung des N-Terminus folgten der Vorgehensweise für den Thioester **156**. Nach der Freisetzung vom Harz und chromatografischer Reinigung konnte **157** mit 7% Ausbeute erhalten werden.

#### 4.3.2 DNA-templatgesteuerte Verknüpfung am Ras-Templat

Die templatgesteuerte Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion wurde zunächst in Gegenwart stöchiometrischer Mengen des DNA-Templats Ras untersucht. Dafür wurden die iodacetylierten PNA-Thioester **156** und **157** mit der bis-Thiol-PNA **158** bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M und 25 °C zur Reaktion gebracht. Auf das Zusetzen eines nukleophilen Reduktionsmittels wurde aufgrund der Kreuzreaktivität mit der Iodacetylgruppe verzichtet. Die HPLC-Spuren zeigten nach zwanzigminütiger Umsetzung für beide Sondenpaare das Signal des linearen Verknüpfungsprodukts **159** an (Abbildung 47), wie eine MALDI/TOF-MS-Analyse bestätigte. Die Ausbeute betrug im Fall des Mercaptopropionsäurethioesters **156** nach 2 min 31% und nach 20 min 86%, wohingegen nach der gleichen Zeit in Abwesenheit des Templats kein Produkt vorlag. Die Reaktion des Mercaptophenyllessigsäurethioesters **157** lieferte das Produkt **159** schon nach 10 s mit einer Ausbeute von 36%, welche sich nach 20 min auf 92% erhöhte. Ohne Templat kam es ebenfalls nicht zur Bildung von **159**. Allerdings zeigte das Chromatogramm ein weiteres Signal an, welches dem PNA-Zyklus **160** zugeordnet wurde.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



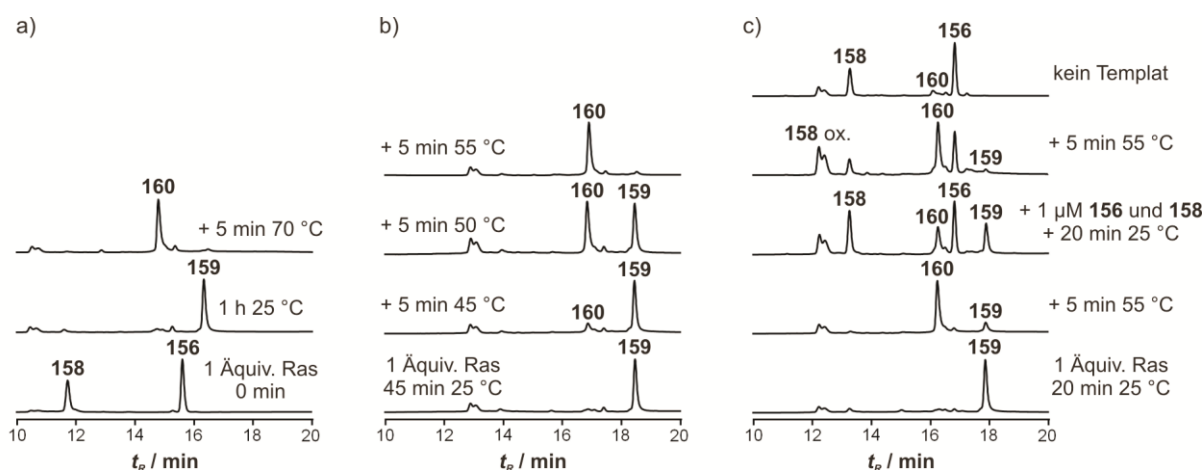
**Abbildung 47:** a), b) HPLC-Spuren der Reaktionen des PNA-Mercaptopropionsäurethioesters **156** bzw. des PNA-Mercatophenyllessigsäurethioesters **157** mit der bis-Thiol-PNA **158** in Gegenwart des DNA-Templats Ras sowie ohne Templat. c) Ausbeuten der templatgesteuerten Umsetzungen (1  $\mu$ M Sonden und ggf. DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.0,  $T = 25^\circ\text{C}$ , HPLC: Gradient 4,  $\lambda = 260$  nm).

Da sich **160** bei beiden Sondenpaaren nicht in Gegenwart des Templats bildete, behinderte dieses offensichtlich die Zyklisierung von **159**. Vermutlich sind die terminalen, reaktiven Gruppen durch die rigide Duplexgeometrie räumlich separiert, sodass keine reaktiven Stöße zugelassen werden. In Abwesenheit des Templats und bei hoher Reaktivität des Thioesters kam es dagegen ausschließlich zur Bildung des zyklischen Produkts **160**, da das primär generierte, lineare Konjugat **159** in einer schnellen, intramolekularen Reaktion zyklisierte. Die Anfangsgeschwindigkeit der templatgesteuerten Reaktion des Mercaptopropionsäurethioesters **156** mit der Isocysteinyl-PNA **158** war mit  $v_{\text{init.}} = 232 \cdot 10^{-11} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  vergleichbar mit der für Umsetzungen von PNA-Benzylthioestern mit Cysteinyl-PNAs berichteten ( $v_{\text{init.}} = 206 \cdot 10^{-11} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ ).<sup>[171]</sup> Die Geschwindigkeit der Ligation des Mercatophenyllessigsäurethioesters **157** war dagegen mit  $v_{\text{init.}} > 2596 \cdot 10^{-11} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  mehr als dreimal höher als die bisher schnellste templatgesteuerte PNA-Verknüpfungsreaktion eines MESNA-Thioesters ( $v_{\text{init.}} = 792 \cdot 10^{-11} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ ).<sup>[175]</sup> Somit hat die Reaktivität der Thioesterkomponente auf die Reaktionsgeschwindigkeit am Ras-Templat einen starken Einfluss. Im Gegensatz zu den Umsetzungen am B-Raf-Templat (Kapitel 4.2) sind die reaktiven Gruppen hier wahrscheinlich schon mit hoher effektiver Molarität angeordnet, sodass keine konformative Änderung des ternären Komplexes die Geschwindigkeit der templatgesteuerten Reaktion bestimmt. Bei der Umsetzung des hochreaktiven Thioesters **157** mit **158** konnte die Hintergrundreaktion bereits nach 20 min detektiert werden. Damit war dieser Thioester für templatgesteuerte Umsetzungen unter *turnover*-Bedingungen ungeeignet, da hier deutlich längere Reaktionszeiten benötigt werden. Eine HPLC-MS-analytische Überprüfung der Stabilität von **157** in

Ligationspuffer offenbarte außerdem dessen hohe Hydrolyseempfindlichkeit. Die folgenden Untersuchungen wurden daher mit dem weniger reaktiven PNA-Mercaptopropionsäurethioester **156** durchgeführt.

### 4.3.3 Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion mit Rezyklisierung des Templats

Das DNA-Templat behinderte die Zyklisierung des linearen Verknüpfungsprodukts **159** bei 25 °C. Wurde die Reaktionslösung der PNA-Konjugate **156** und **158** in Gegenwart von 1 Äquiv. Ras nach erfolgter Ligation für 5 min auf 70 °C erhitzt, konnte das lineare Produkt **159** nicht mehr detektiert werden (Abbildung 48a). Das neu entstandene Signal in der HPLC-Spur wurde mittels MALDI/TOF-MS dem zyklischen Produkt **160** zugeordnet. **160** bildete sich also bei Temperaturen jenseits der Schmelztemperatur des Duplexes **159**•Ras äußerst effizient. Da hohe Temperaturen die templatunabhängige Hintergrundreaktion beschleunigen, wurde die niedrigste Temperatur ermittelt, die zu einer effektiven Zyklisierung von **159** führt: 5 min bei 55 °C bewirkten noch eine nahezu quantitative Umwandlung (Abbildung 48b).



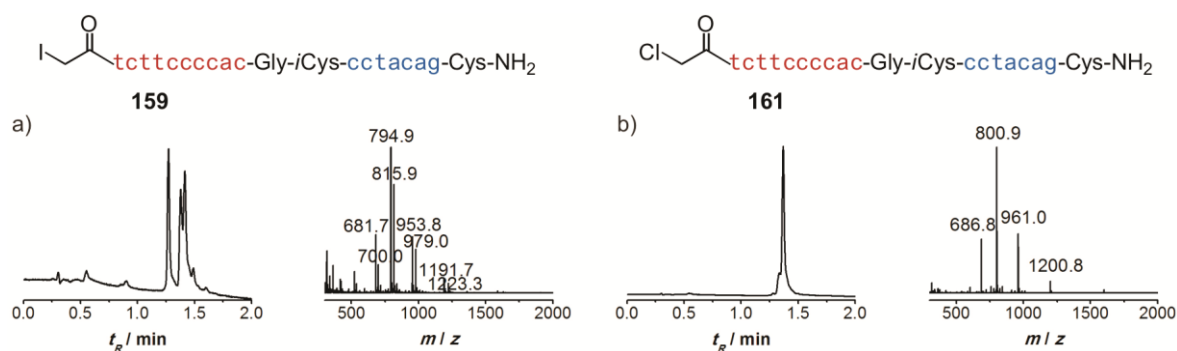
**Abbildung 48:** HPLC-Spuren der Reaktionen des PNA-Thioesters **156** mit der bis-Thiol-PNA **158** in Gegenwart stöchiometrischer Mengen des DNA-Templats Ras. a) Zyklisierung des nach 1 h bei 25 °C gebildeten, linearen Produkts **159** durch Erwärmen der Reaktionslösung auf 70 °C. b) Temperaturabhängigkeit der Zyklisierungsreaktion. c) Nach anfänglicher Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion (20 min bei 25 °C + 5 min bei 55 °C) wurden neue Aliquote von **156** und **158** (je 1 µM) zugesetzt und die Reaktion wiederholt (1 bzw. 2 µM Sonden, ggf. 1 µM DNA-Templat, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.0, HPLC: Gradient 4,  $\lambda$  = 260 nm).

Nach erfolgter Zyklisierung könnte das Templat bei ausreichender Verminderung der Templataffinität von **160** für weitere Verknüpfungsreaktionen zur Verfügung stehen. In einem „Templat-Rezyklisierungsexperiment“ wurden die Sonden **156** und **158** zunächst für 20 min in Gegenwart von 1 Äquiv. Ras bei 25 °C umgesetzt. Anschließendes Erwärmen auf 55 °C

lieferte das zyklische Produkt **160** nach 5 min. Nun wurden neue Aliquote der reaktiven PNA-Konjugate zugesetzt und diese erneut für 20 min bei 25 °C zur Reaktion gebracht. Die HPLC-Analyse belegte die abermalige Bildung des linearen Verknüpfungsprodukts **159**, wenngleich mit verminderter Effizienz (Abbildung 48c). Dieses Resultat bestätigte die Annahme, dass die relativ kurzen PNA-Sonden in der Lage sind, mit dem PNA-Zyklus **160** um die Hybridisierung am Templat zu konkurrieren. Abschließendes Erwärmen auf 55 °C überführte **159** wieder in den Zyklus **160**, der unter identischen Bedingungen in Abwesenheit des Templats nur in Spuren gebildet wurde.

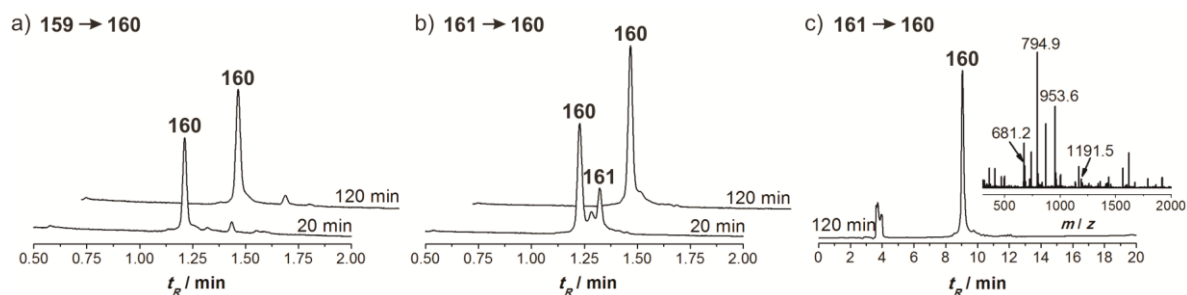
#### 4.3.4 Templataffinitäten der linearen und zyklischen Reaktionsprodukte

Im nächsten Schritt wurde das Ausmaß der durch die Produktzyklisierung verursachten Destabilisierung des Produkt-Templat-Komplexes untersucht. Dazu wurde das iodacetylierte Verknüpfungsprodukt **159**, ein chloracetyliertes Derivat **161** sowie die nicht zur Zyklisierung befähigten, acetylierten PNA-Konjugate **162** und **163** über Festphasensynthese hergestellt (Abbildung 49 und 51). Während **162** das flexible Gly-*i*Cys-Dipeptid enthält, welches im Komplex mit dem Templat einer ungepaarten Base gegenüberliegt, bildet **163** mit Ras einen durchgehend hybridisierten Duplex aus. Im Chromatogramm des gereinigten, iodacetylierten Ligationsprodukts **159** waren mehrere Signale vorhanden (Abbildung 49a). Eine ESI-MS-Analyse ergab, dass das lineare Ligationsprodukt nur als Minderheitskomponente vorlag, während das zyklisierte Produkt **160** die Hauptkomponente bildete. Dieses hatte sich offenbar



**Abbildung 49:** UPLC<sup>®</sup>-Spuren und ESI-MS-Spektren des a) iodacetylierten Verknüpfungsprodukts **159** und des b) chloracetylierten Verknüpfungsprodukts **161**. ESI-MS ( $m/z$ ): **159**:  $[M+4H]^{4+}$ : 1223.3 (ber.: 1223.9),  $[M+5H]^{5+}$ : 979.0 (ber.: 979.3),  $[M+6H]^{6+}$ : 815.9 (ber.: 816.3),  $[M+7H]^{7+}$ : 699.5 (ber.: 699.8); **160** (zyklisch):  $[M+4H]^{4+}$ : 1191.7 (ber.: 1191.9),  $[M+5H]^{5+}$ : 953.8 (ber.: 953.7),  $[M+6H]^{6+}$ : 794.9 (ber.: 794.9),  $[M+7H]^{7+}$ : 681.7 (ber.: 681.5); **161**:  $[M+4H]^{4+}$ : 1200.8 (ber.: 1201.0),  $[M+5H]^{5+}$ : 961.0 (ber.: 961.0),  $[M+6H]^{6+}$ : 800.9 (ber.: 801.0),  $[M+7H]^{7+}$ : 686.8 (ber.: 686.7). UPLC<sup>®</sup>: a)  $t_R = 1.41$  oder  $1.38$  min (**159**),  $1.27$  min (**160**, zyklisch), die Herkunft des dritten Signals ist unbekannt, b)  $t_R = 1.37$  min (**161**), Gradient 10,  $\lambda = 260$  nm).

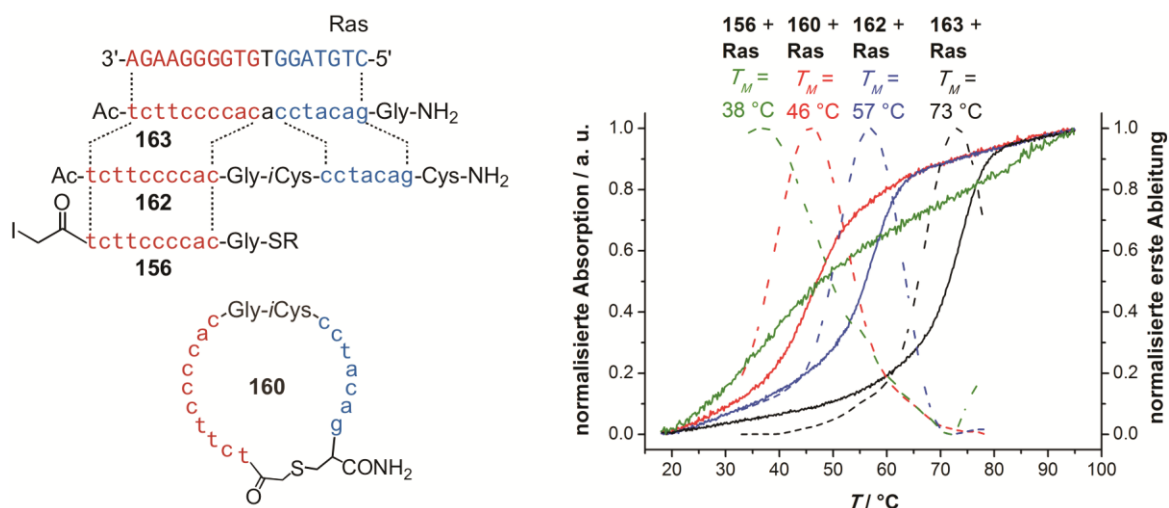




**Abbildung 50:** UPLC<sup>®</sup>-Spuren der Zyklisierungsreaktionen des a) iodacetylierten Verknüpfungsprodukts **159** und des b) chloracetylierten Verknüpfungsprodukts **161**. c) HPLC-Spur und ESI-MS-Spektrum der Umsetzung von **161** nach 120 min (10  $\mu\text{M}$  PNA, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4,  $T = 25^\circ\text{C}$ , UPLC<sup>®</sup>: Gradient 10, HPLC: Gradient 8,  $\lambda = 260$  nm). ESI-MS ( $m/z$ ): **160** (zyklisch):  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1191.5 (ber.: 1191.9),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 953.6 (ber.: 953.7),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 794.9 (ber.: 794.9),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 681.2 (ber.: 681.5).

nach der Reinigung in der sauren Stammlösung gebildet. Das weniger reaktive, chloracetylierte Ligationsprodukt **161** lag dagegen nur als lineare Verbindung vor (Abbildung 49b). Daraufhin wurden die beiden halogenacetylierten PNAs im Ligationspuffer zyklisiert. Nach 20 min zeigte die UPLC<sup>®</sup>-Spur der Reaktion des iodacetylierten Konjugats **159** nur noch das Signal der zyklischen PNA **160**, während dies für die Umsetzung der chloracetylierten Verbindung **161** erst nach 2 h der Fall war (Abbildung 50a, b). Eine HPLC-MS-Analyse bestätigte, dass dieses Signal von Verbindung **160** stammte (Abbildung 50c). Die Geschwindigkeit der Zyklisierungsreaktionen ging demnach mit der Reaktivität des verwendeten Elektrophils einher.

Anschließend wurden Denaturierungsexperimente mit den linearen PNA-Konjugaten **162** und **163** sowie mit dem PNA-Zyklus **160** und dem DNA-Templat Ras durchgeführt (Abbildung 51). Die Schmelztemperatur des Komplexes aus der zyklischen PNA **160** und Ras war mit  $T_M = 46^\circ\text{C}$  um  $11^\circ\text{C}$  geringer als die des Duplexes aus dem linearen Verknüpfungsprodukt **162** und Ras ( $T_M = 57^\circ\text{C}$ ). Der durchgehend gepaarte Duplex **163**•Ras hatte mit  $T_M = 73^\circ\text{C}$  eine deutlich höhere Schmelztemperatur. Somit bewirkte die Zyklisierung des Produkts und die flexible Gly-*i*Cys-Verknüpfungsstelle eine Verminderung der Templataffinität um  $27^\circ\text{C}$ . Allerdings war der  $T_M$  des Produktkomplexes der Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion immer noch  $8^\circ\text{C}$  höher als der des Duplexes aus dem PNA-Thioester **156** und Ras ( $T_M = 38^\circ\text{C}$ ). Diese Resultate belegten die Verminderung der Templataffinität von Produkten aus Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen. Sie zeigten jedoch auch die Grenzen des Konzepts auf, da die Stabilitäten der Produkt-Templat-Duplexe nicht unter jene der Reaktanden-Templat-Komplexe zurückgedrängt werden konnten.

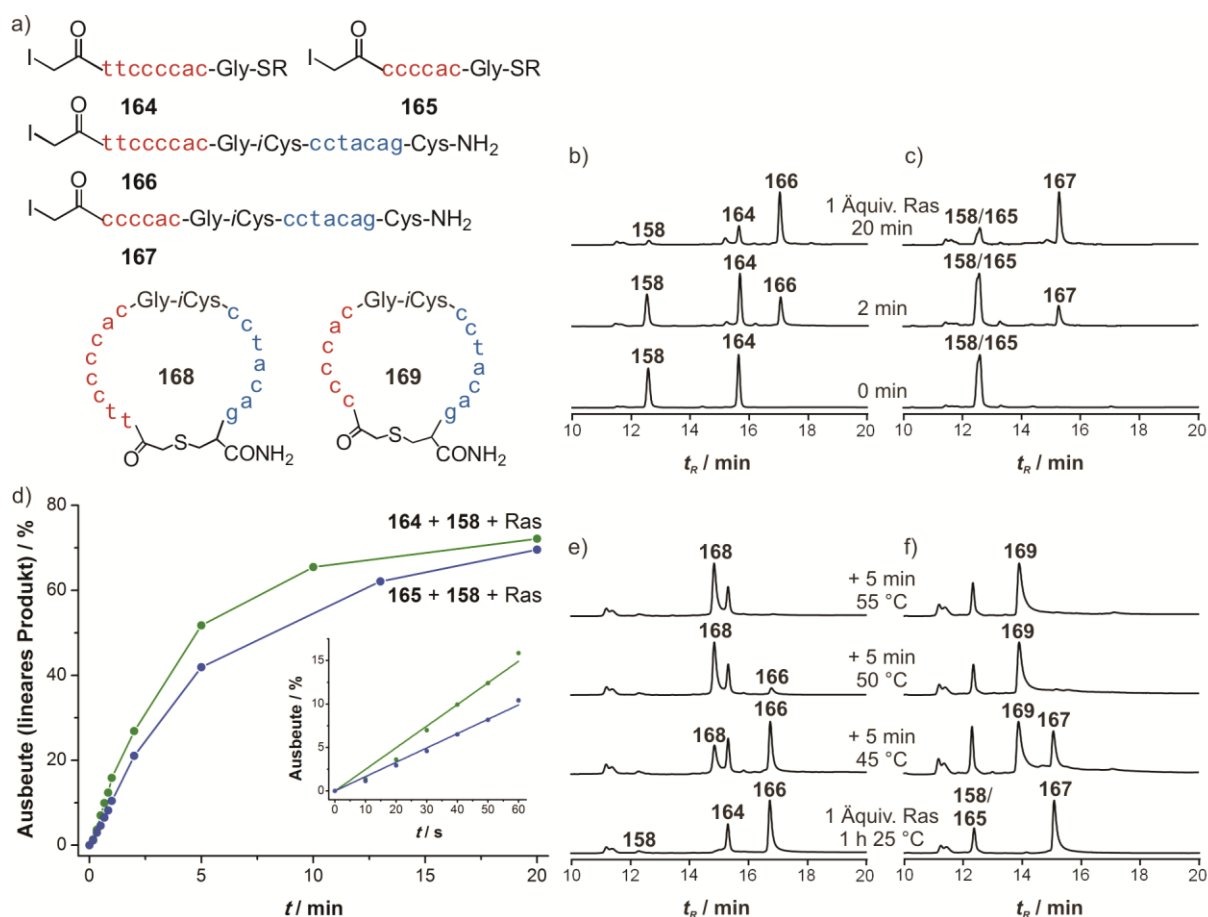


**Abbildung 51:** Normalisierte Schmelzkurven (—) der PNA-Konjugate **156**, **160**, **162** und **163** mit dem DNA-Templat Ras und deren erste Ableitungen (- - -) (1  $\mu$ M PNA-Konjugat und DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 100  $\mu$ M TCEP (außer für PNA **156**), pH = 7.4,  $\lambda$  = 260 nm).

#### 4.3.5 Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen mit substöchiometrischen Templatkonzentrationen

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass der Zyklisierungsschritt nur in der einzelsträngigen Form des Verknüpfungsprodukts nach einer thermisch induzierten Dissoziation des PNA-DNA-Duplexes erfolgte (vgl. Kapitel 4.3.2 und 4.3.3). Daher wurden im Folgenden die Reaktionen der verkürzten, iodacetylierten PNA-Thioester **164** und **165** untersucht (Abbildung 52a). Die im Vergleich zum linearen Verknüpfungsprodukt **159** reduzierte Länge der PNA-Konjugate **166** und **167** sollte die Dissoziation der primär gebildeten Produkt-Templat-Duplexe erleichtern. Die templatgesteuerten Reaktionen mit der bis-Thiol-PNA **158** waren mit  $v_{\text{init.}} = 249 \cdot 10^{-11} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  (**164** + **158**  $\rightarrow$  **166**) bzw.  $v_{\text{init.}} = 165 \cdot 10^{-11} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  (**165** + **158**  $\rightarrow$  **167**) ähnlich groß oder nur geringfügig langsamer als die Umsetzung des längeren Thioesters **156** (Abbildung 52b–e). Während für die vollständige Zyklisierung von **166** fünfminütiges Erwärmen auf 55 °C notwendig war, gelang dies für das kürzere Produkt **167** bereits bei 50 °C (Abbildung 52e, f).

Das Sondenpaar **165** + **158** wurde daraufhin unter Thermozyklierungsbedingungen umgesetzt. Eine Phase bei niedriger Temperatur (25 °C, 1 h) diente der Bildung des linearen Produkts **167**, welches im darauffolgenden Schritt bei 50 °C (5 min) in den Zyklus **169** überführt wurde. In Gegenwart von 0.5 Äquiv. Ras lieferte der erste Thermozyklus **169** mit 36% Ausbeute, welche sich im zweiten Thermozyklus auf 72% verdoppelte (Abbildung 53a). Die Produkte der Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion blockierten unter diesen Bedingungen nicht

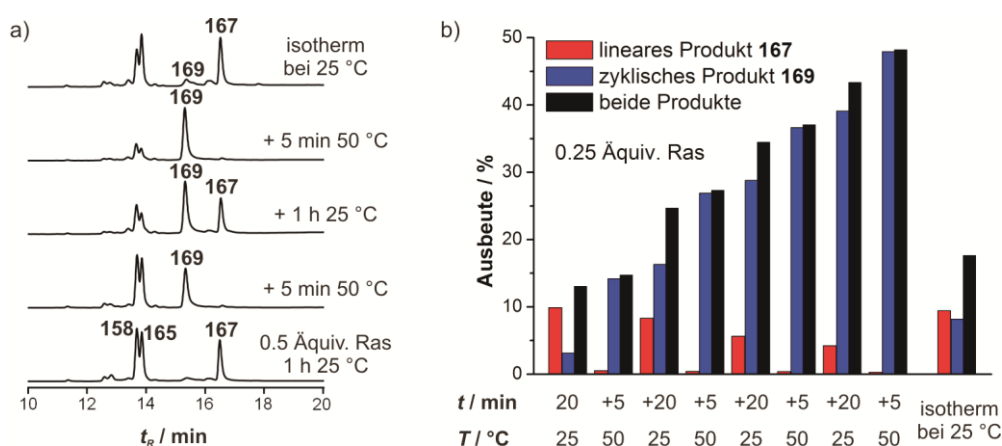


**Abbildung 52:** a) Verkürzte, iodacetylierte PNA-Thioester **164** und **165** sowie die entsprechenden linearen und zyklischen Verknüpfungsprodukte **166–169** ( $R = (CH_2)_2CO-Gly-NH_2$ ). b), c) HPLC-Spuren der Reaktionen der PNA-Thioester **164** bzw. **165** mit der bis-Thiol-PNA **158** in Gegenwart des DNA-Templats Ras bei 25 °C. d) Ausbeuten der templatgesteuerten Umsetzungen. e), f) Temperaturabhängigkeit der Zyklisierungsreaktionen der linearen Produkte **166** und **167** (1  $\mu$ M Sonden und DNA-Templat, 10 mM  $NaH_2PO_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.0, HPLC: Gradient 4,  $\lambda = 260$  nm).

den Zugang der Sonden zum Templat. Eine isotherme Reaktion, die ohne den intermediären Denaturierungsschritt durchgeführt wurde, ergab dagegen eine wesentlich geringere Gesamtausbeute (43%). Die Templatkonzentration wurde weiter verringert (0.25 Äquiv.) und die Phase bei niedriger Temperatur auf 20 min verkürzt. Auch hier kam es zu einem stetigen, wenngleich verringerten Anstieg der Ausbeuten in jedem Thermozyklus (Abbildung 53b).

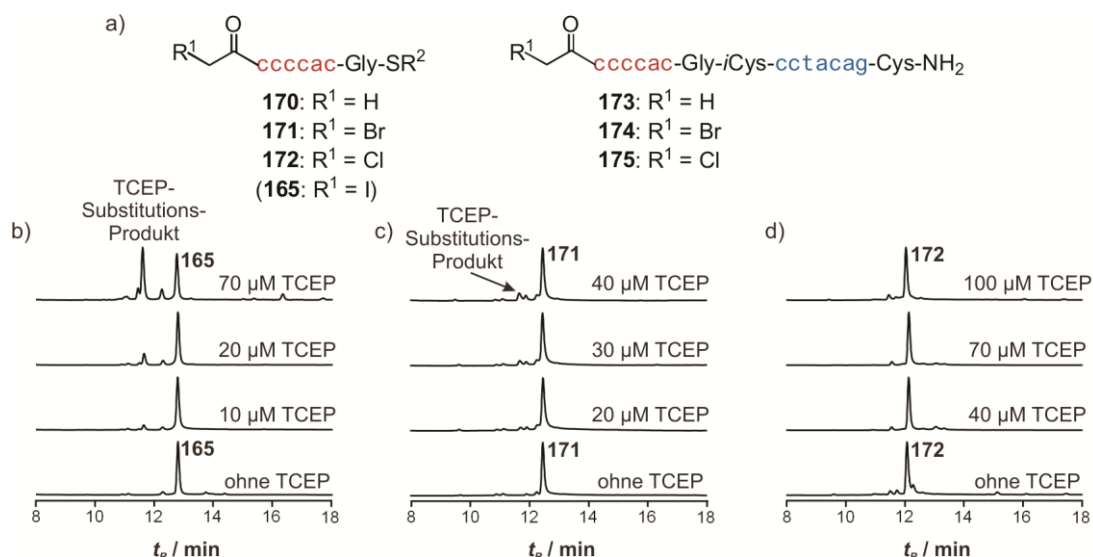
Um den Einfluss der Zyklisierung detaillierter zu studieren, wurde der am N-Terminus acetylierte PNA-Thioester **170** hergestellt (Abbildung 54a). Das aus **170** und **158** gebildete Verknüpfungsprodukt **173** ist nicht zur Zyklisierung befähigt. Bei längeren Reaktionszeiten und erhöhten Temperaturen stellte die Oxidation der bis-Thiol-PNA **158** ein zunehmendes Problem dar (vgl. Abbildung 48c). Da der Iodacetylrest in **165** als empfindlich gegenüber

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 53:** a) HPLC-Spuren der Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion des PNA-Thioesters **165** mit der bis-Thiol-PNA **158** in Gegenwart von 0.5 Äquiv. des DNA-Templats Ras unter den angegebenen Thermozyklierungsbedingungen (HPLC: Gradient 5,  $\lambda = 260$  nm). b) Ausbeuten des linearen (**167**) und des zyklischen (**169**) Verknüpfungsprodukts in Gegenwart von 0.25 Äquiv. Ras unter den angegebenen Thermozyklierungsbedingungen (1  $\mu$ M Sonden, 0.5 bzw. 0.25  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.0).

einer Substitution durch nukleophile Reduktionsmittel wie Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) erachtet wurde, erfolgte außerdem die Synthese der weniger elektrophilen brom- und chloracetylierten PNA-Thioester **171** und **172**. Die halogenacetylierten PNAs **165**, **171** und **172** wurden anschließend bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M in Puffer mit verschiedenen TCEP-Konzentrationen gelöst und zehn Thermozyklen (20 min bei 20 °C + 5 min bei 50 °C)



**Abbildung 54:** a) (Halogen)acetylierte PNA-Thioester **170–172** sowie die entsprechenden linearen Verknüpfungsprodukte **173–175** ( $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_2\text{CO-Gly-NH}_2$ ). b)–d) HPLC-Spuren des b) iodacetylierten PNA-Thioesters **165**, des c) bromacetylierten PNA-Thioesters **171** und des c) chloracetylierten PNA-Thioesters **172** nach 10 Thermozyklen (20 min bei 20 °C + 5 min bei 50 °C) in Gegenwart verschiedener TCEP-Konzentrationen (1  $\mu$ M PNA-Konjugat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.0, HPLC: Gradient 6,  $\lambda = 260$  nm).

### 4.3 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen

ausgesetzt. Während das iodacetylierte Konjugat **165** nur 10  $\mu\text{M}$  TCEP tolerierte, konnten für die brom- und chloracetylierten Verbindungen **171** und **172** 30  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  TCEP eingesetzt werden, ohne dass es zu einer nennenswerten Bildung von Substitutionsprodukten kam (Abbildung 54b–d). Die Reaktionen der drei halogenacetylierten PNA-Thioester **165**, **171** und **172** sowie des acetylierten PNA-Thioesters **170** mit der bis-Thiol-PNA **158** wurden daraufhin unter Thermozyklierungsbedingungen durchgeführt (4× 20 min bei 20 °C + 5 min bei 50 °C). In Abwesenheit des Templats waren alle Umsetzungen mit 0–3% Ausbeute ineffizient (Tabelle 2). In Gegenwart von 0.25 Äquiv. Ras lieferte der iodacetylierte Thioester **165** 44% des zyklischen Produkts **169**, während der bromacetylierte Thioester **171** zu einer Ausbeute von 36% führte. Offensichtlich folgten die Ausbeuten der Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen der Reihenfolge der Elektrophilie der Halogenacetyleinheiten. Die Zyklisierung über die Chloridsubstitution war deutlich langsamer (vgl. auch Abbildung 50b), und so lieferte die Reaktion des chloracetylierten Thioesters **172** nur 21% des PNA-Zyklus **169** und 5% des linearen Verknüpfungsprodukts **175**. Da das Ligationsprodukt **173** aus dem acetylierten Thioester **170** und **158** nicht zur Zyklisierung befähigt ist, wurde es mit der geringsten Ausbeute gebildet (16%). **173** konkurrierte demnach erfolgreich mit den reaktiven Sonden um den Zugang zum Templat. Dieser Befund stellt die durch die Produktzyklisierung verminderte Templataffinität als Ursache für die erhöhten Ausbeuten bei Reaktionen mit substöchiometrischen Templatmengen heraus und schließt einen bloßen Thermozyklisierungseffekt aus.

**Tabelle 2:** Ausbeuten der templatgesteuerten (0.25 Äquiv Ras) und templatunabhängigen Umsetzungen verschiedener (halogen)acetylierter PNA-Thioester mit der bis-Thiol-PNA **158** (1  $\mu\text{M}$  Sonden, ggf. 0.25  $\mu\text{M}$  DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 10  $\mu\text{M}$  TCEP, pH 7.0, 4× 20 min bei 20 °C + 5 min bei 50 °C).

PNA-Thioester:	<b>165</b> (IAc)	<b>171</b> (BrAc)	<b>172</b> (ClAc)	<b>170</b> (Ac)
0.25 Äquiv. Ras	44%	36%	26%	16%
ohne Templat	3%	1%	0%	2%

Um den *turnover* der Reaktion zu verstärken, wurde die Sondenkonzentration auf 5  $\mu\text{M}$  und die Anzahl der Thermozyklen auf zehn erhöht. Da dies templatunabhängige Reaktionen begünstigt, kam der weniger reaktive chloracetylierte PNA-Thioester **172** zum Einsatz. Die Ausbeuten wurden mit der Reaktion des nicht zur Zyklisierung befähigten Sondenpaars **170** + **158** verglichen (Tabelle 3). In Gegenwart von 0.1 bzw. 0.01 Äquiv. des DNA-Templats lieferte die Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion (**172** + **158**) 22.5% bzw. 2.3% mehr Ausbeute als in Abwesenheit des Templats. Dies war ungefähr doppelt so viel wie bei der Verknüp-

## 4. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 3:** Ausbeuten (in Klammern hintergrundkorrigiert) der templatgesteuerten (0.1–0.001 Äquiv. Ras) und der templatunabhängigen Umsetzung des chloracetylierten PNA-Thioesters **172** (Verknüpfungs-Zyklusierungsreaktion, Summe aus zyklischem und linearem Produkt) sowie des acetylierten PNA-Thioesters **170** (Verknüpfungsreaktion) mit der bis-Thiol-PNA **158** (5  $\mu$ M Sonden, ggf. 0.5–0.005  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 70  $\mu$ M TCEP, pH 7.0, 10 $\times$  20 min bei 25 °C + 5 min bei 50 °C oder isotherm für 24 h bei 25 °C, Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, Fehler = 1  $\sigma$ ). Die isotherme Reaktion **170** + **158** wurde nur einmal durchgeführt.

Sondenpaar	0.1 Äquiv. Ras	0.01 Äquiv. Ras	0.001 Äquiv. Ras	ohne Templat
<b>172 + 158</b> (Thermozyklisierung)	36.1% $\pm$ 1.9% (22.5% $\pm$ 1.9%)	15.9% $\pm$ 0.5% (2.3% $\pm$ 0.6%)	14.0% $\pm$ 0.9% (0.4% $\pm$ 1.0%)	13.7% $\pm$ 0.1%
<b>170 + 158</b> (Thermozyklisierung)	22.4% $\pm$ 0.7% (9.7% $\pm$ 1.3%)	13.8% $\pm$ 0.6% (1.1% $\pm$ 1.2%)	13.0% $\pm$ 0.2% (0.3% $\pm$ 0.8%)	12.7% $\pm$ 0.6%
<b>172 + 158</b> (isotherm)	61.0% $\pm$ 0.7% (21.2% $\pm$ 2.0%)	43.8% $\pm$ 0.6% (4.0% $\pm$ 1.8%)	41.2% $\pm$ 1.3% (1.4% $\pm$ 2.6%)	39.8% $\pm$ 1.3%
<b>170 + 158</b> (isotherm)	56.4% (10.6%)	46.3% (0.6%)	45.0% (0%)	45.7%

fungsreaktion ohne Zyklisierung (**170** + **158**), die unter identischen Bedingungen nur 9.7% bzw. 1.1% mehr Ligationsprodukt als die Hintergrundreaktion ergab. Dies verdeutlichte abermals die Vorteile der Produktzyklisierung. Bei einer Verringerung der Templatkonzentration auf 5 nM (0.001 Äquiv.) konnte für keines der Sondenpaare ein statistisch signifikanter Umsatz über dem Hintergrund gemessen werden.

Die Reaktion verlief ebenfalls mit *turnover*, wenn sie isotherm durchgeführt wurde. Nach 24 h Reaktion bei 25 °C ergab das Sondenpaar **172** + **158** hintergrundkorrigierte Ausbeuten von 21.2% (0.1 Äquiv. Ras) und 4.0% (0.01 Äquiv. Ras). Auch in diesem Fall überstiegen sie die des Sondenpaars **170** + **158** signifikant (10.6% und 0.6% bei 0.1 Äquiv. und 0.01 Äquiv. Ras). Allerdings waren für beide isothermen Reaktionen die Hintergrundaussbeuten deutlich größer (39.8% bzw. 45.7%) als für die Umsetzung mit Thermozyklisierung (13.7% bzw. 12.7%), welche außerdem mit ca. 4 h wesentlich weniger Zeit in Anspruch nahm.

### 4.3.6 Diskussion

Die vorgestellte PNA-Verknüpfungs-Zyklusierungsreaktionssequenz stellt einen neuen, potentiell allgemeinen Ansatz zur Verminderung der Produktinhibierung in nukleinsäure-templatgesteuerten Reaktionen dar. Bisherige Methoden beschränkten sich auf die Induzierung einer lokal begrenzten Störung des Basenstapels der Produkt-Templat-Duplexe.<sup>[115,116,148,149,164,175]</sup> Dagegen führt die hier beschriebene Reaktionssequenz zu einer

globalen Konformationsänderung der Reaktionsprodukte, welche eine umfassendere Destabilisierung bewirkt.

Das Templat löste zunächst eine native chemische Verknüpfungsreaktion zwischen halogen-acetylierten PNA-Glycylthioestern und Isocysteiny-PNA-Cysteiny-Konjugaten aus. In einem nachgelagerten Schritt erfolgte die Zyklisierung der linearen Verknüpfungsprodukte durch eine schnelle Thiol→Halogenid-Substitutionsreaktion. Dazu bedurfte es einer Dissoziation des eingangs gebildeten Produktduplexes, da dessen Rigidität reaktive Stöße zwischen den funktionalisierten Termini verhinderte. Thermozyklisierung war dafür ein geeignetes Mittel. Alternativ gelang die Zyklisierung auch unter isothermen Bedingungen, wenn die Dissoziation durch die geringe Konzentration des linearen Produkts in der Anfangsphase der Reaktion begünstigt war. Sowohl die Verknüpfungs- als auch die Zyklisierungsreaktion verliefen rasch. Beispielsweise lieferte der iodacetylierte PNA-Thioester **156** mit der bis-Thiol-PNA **158** bei äquimolaren Templatkonzentrationen nach 20 min das lineare Verknüpfungsprodukt mit 86% Ausbeute, welches nach 5 min quantitativ zyklisierte.

Der Vorteil der Produktzyklisierung konnte durch eine Reihe von Experimenten belegt werden. So bewirkte das Templat unter Thermozyklisierungsbedingungen die Bildung von neuen Produktmolekülen, wenn nach erfolgter Reaktion frische Reaktanden zugeführt wurden. In Gegenwart von 0.25 Äquiv. des Templates lieferte die Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion außerdem bis zu dreifach höhere Ausbeuten als eine Verknüpfungsreaktion von nicht zur Zyklisierung befähigten PNA-Konjugaten. Auch bei weiter verringerten Templatmengen (0.1–0.01 Äquiv.) verdoppelte sich die Ausbeute, ohne dass es zu einer Erhöhung der Hintergrundreaktion durch die zusätzlichen Funktionalitäten kam. Trotzdem konnte die Reaktionssequenz bei niedrigen nanomolaren Templatkonzentrationen keine detektierbaren Produktmengen über dem Hintergrund erzeugen. Der Grund dafür lag wahrscheinlich in der zwar großen, aber nicht ausreichend hohen Destabilisierung des Produkt-Templat-Komplexes. So induzierte die Zyklisierung des Verknüpfungsprodukts zwar eine deutliche Abnahme der Templateffinität gegenüber der eines linearen Verknüpfungsprodukts mit einer Basenlücke ( $\Delta T_M = -11\text{ °C}$ ). Allerdings konnte diese nicht die Zunahme der Affinität zum Templat kompensieren, welche durch die Verknüpfung der Reaktanden hervorgerufen wurde ( $\Delta T_M = +19\text{ °C}$ ).

Eine Möglichkeit, die Destabilisierung weiter zu verstärken, bestünde in der Verwendung von kürzeren Zyklisierungslinkern.<sup>[250,251]</sup> In dem jetzigen Format betrug dessen Länge 12  $\sigma$ -Bindungen, wenn von der Anbindungsstelle der Nukleobasen an den beiden terminalen PNA-Monomeren gezählt wird. Die Verwendung von modifizierten PNA-Monomeren mit beispielsweise *N*-(2-Halogenethyl)-Glycin- und *N*-(2-Aminoethyl)-Cystein-Rückgraten könnte die Länge auf 6  $\sigma$ -Bindung reduzieren. Andererseits würde das Potential der Methode auch verbessert werden, wenn die mit der Verknüpfung einhergehende Affinitätszunahme der linearen Produkte kleiner ausfiele. Hier böte sich die Verwendung von DNA-basierten Reaktanden an. DNA zeichnet sich im Vergleich zu PNA durch eine geringere Zunahme der Schmelztemperatur pro zusätzliches Basenpaar aus.<sup>[46,48]</sup> Daher sollte diese auch bei einer Verknüpfungsreaktion geringer ausfallen als für PNA-basierte Reaktanden. Ein weiterer, vielversprechender Ansatz ist im folgenden Kapitel beschrieben. Hier wurde die Produktzyklisierung mit Reaktionen kombiniert, die nicht zu einer Verknüpfung der Reaktanden führen.

#### 4.4 DNA-templatgesteuerte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen

Bei templatgesteuerten Reaktionen, in denen chemische Gruppen von einem Oligonukleotid auf ein anderes übertragen werden, ändert sich die Länge der involvierten Nukleinsäurekonjugate nicht. Daher ist die Produktinhibierung hier *per se* wesentlich kleiner als bei templatgesteuerten Verknüpfungsreaktionen. Die von Grossmann und Seitz entwickelten Acyltransferreaktionen zwischen PNA-Thioestern und Aminothiol-PNAs, die nach einem NCL-basierten Mechanismus verlaufen, zeichneten sich durch hohen *turnover* und niedrige Hintergrundraten aus.<sup>[188–190]</sup> Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Verknüpfungsreaktionen müssen für Transferreaktionen die Acyl- und Thiolkomponenten im PNA-Thioester **176** vertauscht werden, sodass nun der PNA-Rest die Thiolabgangsgruppe bildet (Abbildung 55). Der Acylrest wird dann auf die mit einem vicinalen Aminothiol funktionalisierte Akzeptorsonde **177** übertragen. Es war das Ziel, eine nukleinsäuretemplatgesteuerte Acyltransferreaktion mit einer Zyklisierung der Produktsonden **178** und **179** zu verknüpfen. Dadurch besteht die Möglichkeit der templatvermittelten Synthese von Reaktionsprodukten,



**Abbildung 55:** Acyltransferreaktion des PNA-Thioesters **176** mit der Aminothiol-PNA **177**.

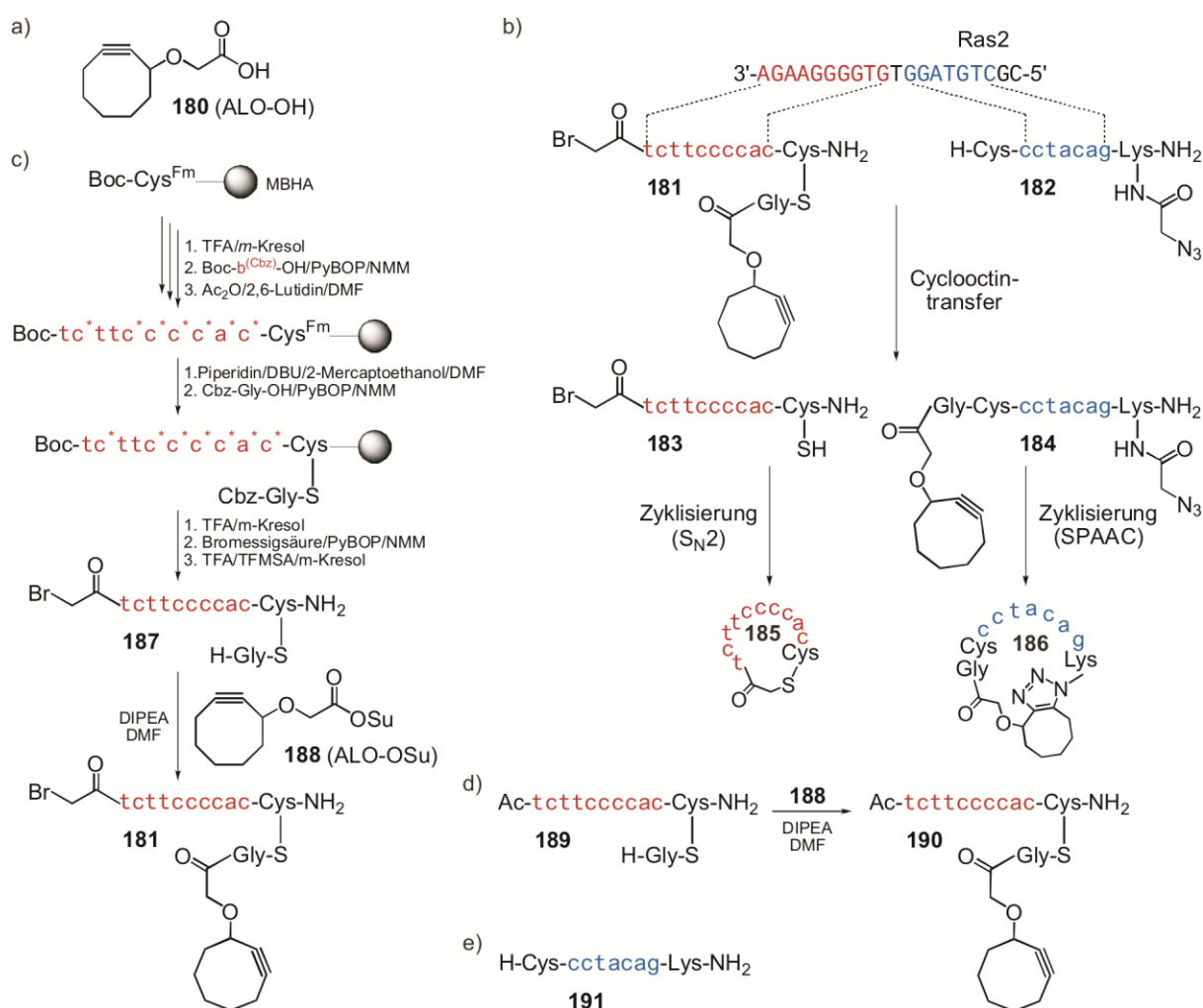


die sich durch niedrigere Templataffinitäten als die Eduktsonden auszeichnen. Dies könnte die Produktinhibierung des Templates weiter zurückdrängen und dadurch dessen katalytische Aktivität steigern.

### 4.4.1 Synthese von bis-funktionalisierten PNA-Konjugaten für Transfer-Zyklisierungsreaktionen

Die Herausforderung im Aufbau der Sonden für die Transfer-Zyklisierungsreaktionen bestand in der geeigneten Wahl von chemisch orthogonalen, reaktiven Gruppen. Diese durften keine intramolekulare Zyklisierung der Reaktanden zulassen, während sie nach der erfolgten Transferreaktion eine rasche Zyklisierung der Produktsonden einleiten sollten. Die Thiol→Halogenid-Substitution hatte sich zur Zyklisierung der Verknüpfungsprodukte bewährt (vgl. Kapitel 4.3). Daher war sie ebenfalls für die Zyklisierung des Transferprodukts vorgesehen, welches aus der Überträgersonde (Acylonor) gebildet wird. Durch eine Halogenacetylierung des N-Terminus kann eine der dafür benötigten Funktionalitäten bereitgestellt werden. Der zu übertragende Acylrest dient dabei gleichzeitig als Schutzgruppe und verhindert eine Zyklisierung der Eduktsonde. Erst nach erfolgtem Transfer wird das hierfür notwendige Thiol freigegeben. Für die Zyklisierung der Akzeptorsonde musste eine alternative Verknüpfungsschemie gefunden werden. Für diesen Zweck erschien die auf Pionierarbeiten von Wittig und Krebs<sup>[255]</sup> basierende und von Bertozzi und Mitarbeitern zu einer biokompatiblen Kupplungsmethode weiterentwickelte ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)<sup>[256–260]</sup> als geeignet. Sie beruht auf der Reaktion von Cyclooctinen mit Aziden und führt zur Bildung von Triazolen. Durch die Verdrehung der Bindungswinkel der beteiligten sp-hybridisierten Kohlenstoffatome der Cyclooctine (~160°) in Richtung des Übergangszustandes der (3+2)-Cycloaddition läuft sie ohne die Anwesenheit von Übergangsmetallkatalysatoren wie Cu(I) spontan ab.<sup>[259]</sup> Da die Zyklisierung der Akzeptorsonde intramolekular bei hoher effektiver Molarität stattfinden würde, wurde auf das Cyclooctin mit einer der niedrigsten berichteten Reaktivitäten zurückgegriffen (**180**, *aryl-less octyne* (ALO-OH), Abbildung 56a).<sup>[261,262]</sup> Dies und die in templatgesteuerten Reaktionen verwendeten niedrigen Konzentrationen verminderten die Gefahr der Kreuzreaktivität von Thiolen und Cyclooctinen.<sup>[263]</sup> Es war demnach vorgesehen, eine Cyclooctineinheit auf eine azidfunktionalisierte Cysteinyl-Akzeptorsonde zu übertragen, welche daraufhin den zweiten PNA-Zyklus über einen Triazollinker generiert (Abbildung 56b).

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 56:** a) Das Cyclooctin **180** (ALO-OH) kann mit Aziden eine ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) eingehen. b) Der bromacetylierte PNA-Gly-ALO-Thioester **181** hybridisiert am Templat Ras2 unter Ausbildung einer ungepaarten Templatbase neben der azidmodifizierten Cys-PNA **182**. Nach dem templatgesteuerten Cyclooctintransfer können beide linearen Transferprodukte **183** und **184** zu den Produkten **185** und **186** zyklisieren. c) Syntheschema für den bromacetylierten PNA-Gly-ALO-Thioester **181**. Die exozyklischen Aminogruppen der mit \* gekennzeichneten Nukleobasen tragen Cbz-Schutzgruppen. d) Synthese des acetylierten PNA-Gly-ALO-Thioesters **190** aus dem Vorläufer **189**. e) Die nicht azidmodifizierte Cys-PNA **191** ist nach erfolgreichem Cyclooctintransfer nicht zur Zyklisierung befähigt.

Zunächst wurde der bromacetylierte PNA-Glycyl-ALO-Thioester **181** synthetisiert. Ursprünglich war geplant, die PNA-Sequenz an mit Fmoc-Cys<sup>Mmt</sup>-OH funktionalisiertem Rink Amid-Harz unter Verwendung von Fmoc/Bhoc-geschützten PNA-Monomeren aufzubauen. Die anschließende Behandlung mit 2%iger TFA in Dichlormethan in Gegenwart von Triisopropylsilan (TIS) sollte die Mmt-Schutzgruppe vom Thiol des Cysteins selektiv entfernen.<sup>[188]</sup> Die anschließende, exemplarische Kupplung von Boc-Gly-OH lieferte jedoch mehrfach glycinhaltige Verbindungen. Wahrscheinlich führte die verdünnte Säure schon nach wenigen

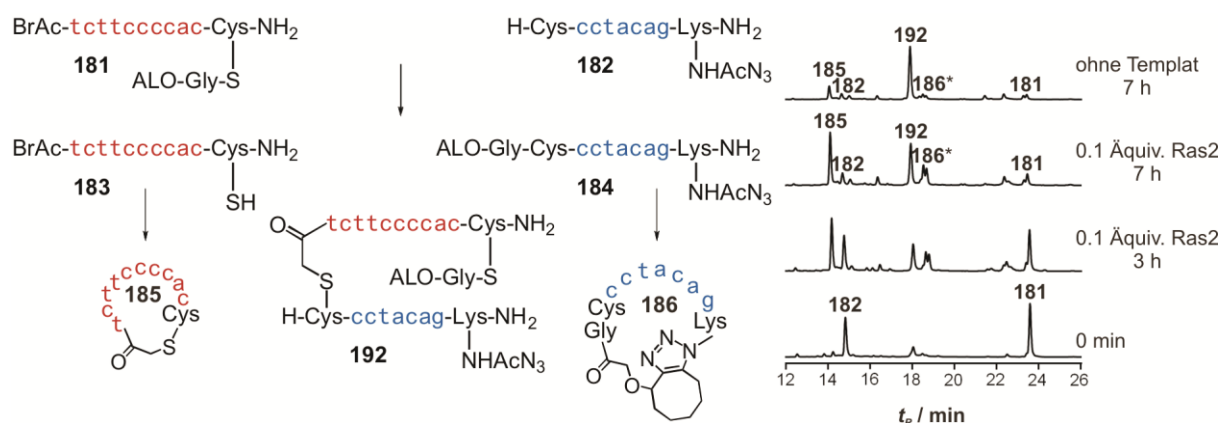
Minuten auch zu einem teilweisen Verlust der Bhoc-Schutzgruppen an den exozyklischen Aminofunktionen der PNA-Monomere.

Als Alternative wurde eine Synthesestrategie entwickelt, die auf der Verwendung von Boc/Cbz-geschützten PNA-Monomeren und der basenlabilen Fm-Schutzgruppe<sup>[264,265]</sup> (Fm = 9-Fluorenylmethyl) beruhte (Abbildung 56c). Dazu wurde MBHA-Harz mit Boc-Cys<sup>Fm</sup>-OH beladen und die PNA-Sequenz über manuelle Festphasensynthese aufgebaut. Eine Lösung aus Piperidin, DBU und 2-Mercaptoethanol in DMF entfernte die Fm-Schutzgruppe von der Seitenkette des Cysteins der harzgebundenen Spezies. Dabei war es wichtig, die Deblockierung in Gegenwart eines überschüssigen Thiols durchzuführen, da es sonst zur Bildung von Oxidationsprodukten des Cysteins kam. Die darauffolgende Umsetzung der freien Thiolfunktion mit Cbz-Gly-OH diente dem Aufbau des Glycylthioesters. Abschließend wurde der N-Terminus durch TFA/*m*-Kresol deblockiert und mit Bromessigsäure halogenacetyliert. Die TFA/TFMSA-vermittelte Freisetzung von der festen Phase in Gegenwart des Kationenfängers *m*-Kresol lieferte das PNA-Konjugat **187** nach chromatografischer Reinigung mit 36% Ausbeute. Die Synthesestrategie war nicht auf die Anbringung des Cyclooctins **180** an der festen Phase ausgerichtet, da Cyclooctine unter den harschen Abspaltbedingungen Reaktionen mit Kationenfängern eingehen können.<sup>[266]</sup> Daher wurde **180** in den entsprechenden Succinimidylester **188** überführt und mit dem freien N-Terminus des Glycins im PNA-Konjugat **187** in Lösung zur Reaktion gebracht. Erneute Reinigung mittels HPLC ergab den bromacetylierten PNA-Glycyl-ALO-Thioester **181** mit 24% Ausbeute. Eine analoge Vorgehensweise ermöglichte die Synthese des acetylierten Thioesters **190** aus dem Vorläufer **189** mit 40% Ausbeute (Abbildung 56d). **190** ist nach Abgabe der Glycylcyclooctineinheit nicht zur Bildung des zyklischen Produkts **185** in der Lage und diente als Kontrollverbindung. Die Synthese der azidylierten Cysteinyl-PNA **182** sowie der nicht azidmodifizierten PNA **191** (Abbildung 56b, e) wurde von Dr. van der Heden van Noort an mit Boc-Lys<sup>Fmoc</sup>-OH funktionalisiertem MBHA-Harz durchgeführt.

##### 4.4.2 DNA-templatgesteuerte Transfer-Zyklisierungsreaktionen mit substöchiometrischen Templatkonzentrationen

Die Reaktion des bromacetylierten PNA-Glycyl-ALO-Thioesters **181** mit der azidmodifizierten Cysteinyl-PNA **182** (1  $\mu$ M) in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 wurde anschließend mittels HPLC untersucht. Nach 7 h bei 30 °C waren die Signale der Eduktsonden nahezu verschwunden (Abbildung 57). Das neu entstandene Signal mit der

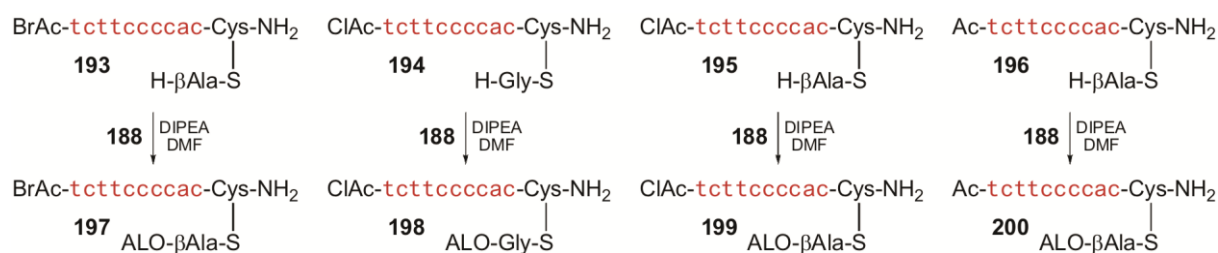
#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 57:** HPLC-Spuren der Transfer-Zyklisierungsreaktion des bromoacetylierten PNA-Gly-ALO-Thioesters **181** mit der azidmodifizierte Cysteinyl-PNA **182** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden, ggf. 0.1  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20  $\mu$ M TCEP, pH 7.0,  $T = 30^\circ\text{C}$ , HPLC: Gradient 7,  $\lambda = 260\text{ nm}$ ). \* Es wurden beide Regioisomeren von **186** gebildet.

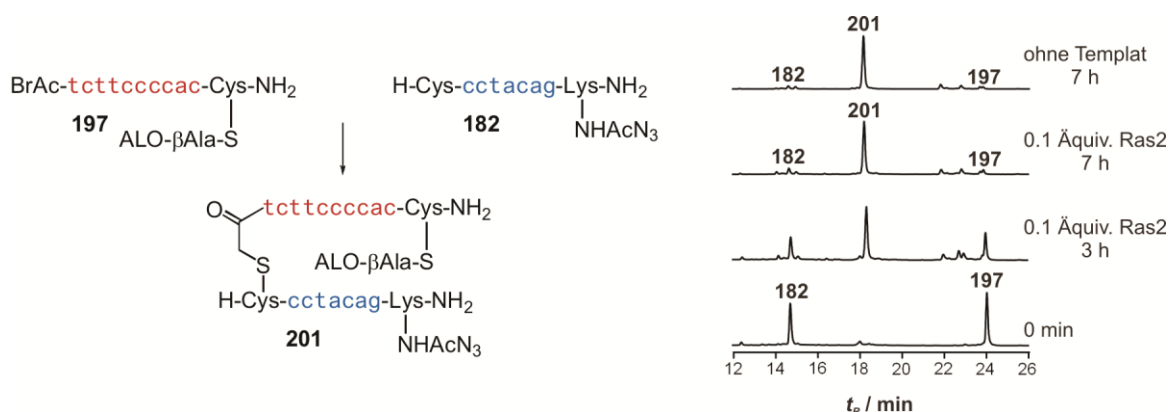
geringsten Retentionszeit ( $t_R = 14.2\text{ min}$ ) konnte durch die im Multiwellenlängenmodus durchgeführte HPLC-Analyse einem Reaktionsprodukt der Thioestersonde **181** zugeordnet werden. Dessen Absorptionsmaximum lag wie das von Verbindung **181** bei 272 nm. Da der Umsatz bei substöchiometrischen Templatmengen annähernd quantitativ war, mussten die Produktmoleküle vom Templat verdrängt worden sein. Daher sollte es sich bei dem Produkt um den Zyklus **185** handeln, da die intramolekulare Thiol $\rightarrow$ Bromid-Substitution schnell erfolgen würde. Dies wurde durch später durchgeführte massenspektrometrische Analysen bestätigt (vgl. Abbildung 62c). Das Doppelsignal bei  $t_R = 18.6\text{--}18.8\text{ min}$  entsprach dem zweiten PNA-Zyklus **186**. Dessen Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\text{max.}} = 264\text{ nm}$ ) war identisch mit dem der Akzeptorsonde **182**. Wahrscheinlich wurden beide regioisomeren Produkte gebildet, da die nicht übergangsmetallkatalysierte (3+2)-Cycloaddition keine Regiospezifität besitzt. Interessanterweise entstand neben den erwarteten Produkten noch eine weitere Spezies, deren Absorptionsmaximum zwischen denen der beiden Eduktsonden lag ( $\lambda_{\text{max.}} = 269\text{ nm}$ ). Vermutlich entstand bei den langen Reaktionszeiten das Verknüpfungsprodukt **192**, welches durch die intermolekulare Substitution des Bromids in **181** durch die Thiolgruppe in **182** gebildet wird. **192** war in Abwesenheit des Templats das dominierende Reaktionsprodukt, da hier die Reaktanden nicht in einem ternären Komplex gebunden wurden. Dieser ordnet die PNA-Konjugate in einer für die Verknüpfung ungünstige Geometrie an. In Abwesenheit des Templats entstanden nur geringe Mengen des triazolhaltigen Zyklus **186**, was auf eine geringe Rate der templatunabhängigen Transferreaktion schließen ließ. Der in höherer Konzentration gebildete zweite Zyklus **185** musste daher aus der Hydrolyse des Thioesters stammen.

#### 4.4 DNA-templatgesteuerte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen

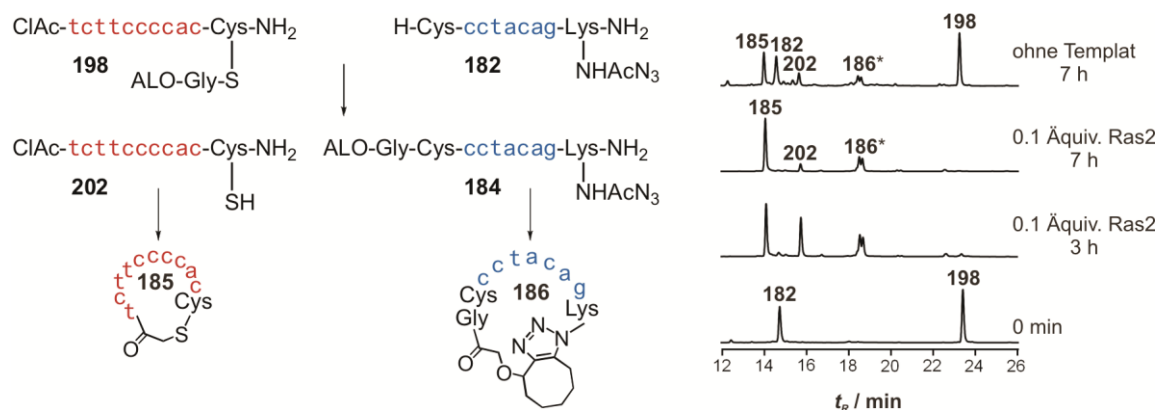


**Abbildung 58:** Synthese des bromacetylierten PNA-βAlanyl-ALO-Thioesters **197**, der chloracetylierten PNA-Glycyl- (**198**) bzw. -βAlanyl-ALO-Thioester (**199**) sowie des acetylierten PNA-βAlanyl-ALO-Thioesters **200** aus den PNA-Konjugaten **193**–**196** durch Umsetzung mit dem ALO-Succinimidylester **188** (ALO-OSu).

Um die Hydrolyse des Thioesters sowie die Verknüpfung der Sonden zurückzudrängen, wurden die weniger reaktiven PNA-Thioester **197**–**200** analog zu Verbindung **181** dargestellt (Abbildung 58). Die Festphasensynthese der Vorläuferkonjugate **193**–**196** gelang mit Ausbeuten von 23–46% und die anschließende Umsetzung mit dem Cyclooctinsuccinimidylester **188** lieferte die gewünschten Verbindungen mit 21–40% Ausbeute. Zunächst wurde der bromacetylierte PNA-βAlanylthioester **197** mit der azidmodifizierte Cysteinyl-PNA **182** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des Templats sowie in dessen Abwesenheit zur Reaktion gebracht. Die verringerte Elektrophilie des βAlanylthioesters in **197** drängte dessen Hydrolyse zurück (vgl. Kapitel 4.2.14), da die HPLC-Spuren nach 7 h Reaktion ohne Templat kein Signal des zyklisierten Produkts **185** zeigten (Abbildung 59). Durch die weiterhin hohe Reaktivität der Bromacetylgruppe entstand nun unabhängig vom Vorliegen des Templats ausschließlich das Verknüpfungsprodukt **201**, wie eine MALDI/TOF-MS-Analyse bestätigte. Die Überträger-sonden **181** und **197** waren also aufgrund der zu hohen Reaktivität der Bromacetylgruppe

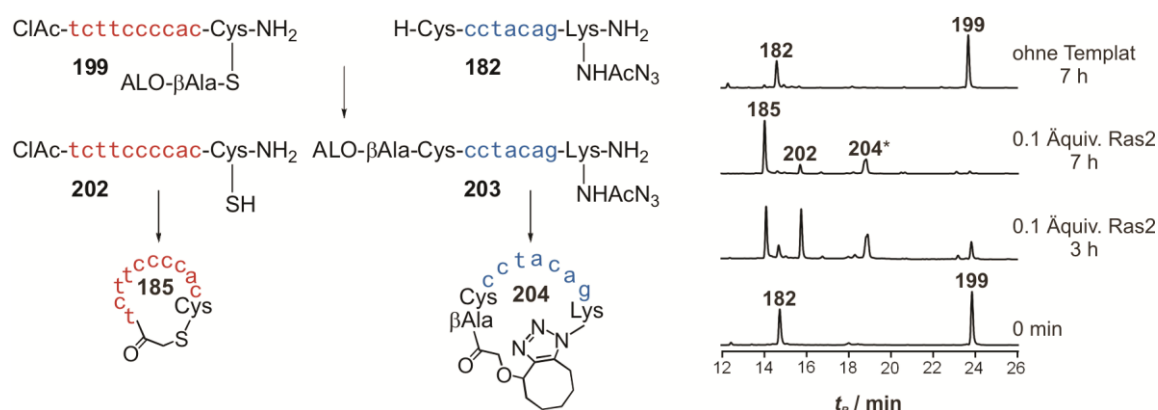


**Abbildung 59:** HPLC-Spuren der Reaktion des bromacetylierten PNA-βAla-ALO-Thioesters **197** mit der azidmodifizierten Cysteinyl-PNA **182** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat (1 μM Sonden, ggf. 0.1 μM DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20 μM TCEP, pH 7.0,  $T = 30$  °C, HPLC: Gradient 7,  $\lambda = 260$  nm).



**Abbildung 60:** HPLC-Spuren der Transfer-Zyklisierungsreaktion des chloracetylierten PNA-Gly-ALO-Thioesters **198** mit der azidmodifizierten Cysteinyln-PNA **182** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden, ggf. 0.1  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20  $\mu$ M TCEP, pH 7.0,  $T = 30^\circ\text{C}$ , HPLC: Gradient 7,  $\lambda = 260$  nm). \* Es wurden beide Regioisomeren von **186** gebildet.

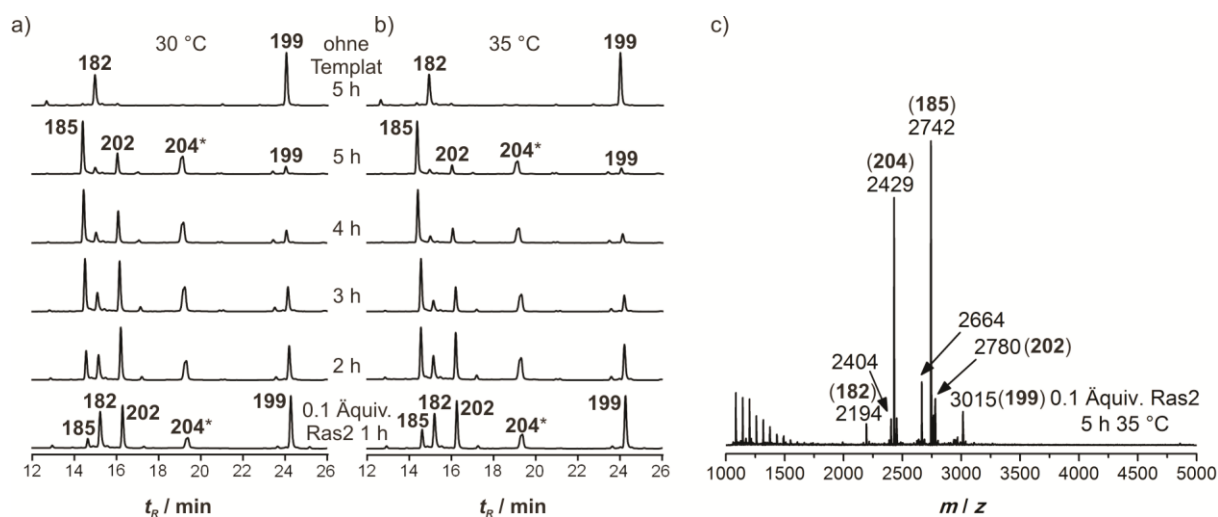
nicht für längere Umsetzungen mit der nukleophilen Cysteinyln-PNA **182** geeignet. Als nächstes wurde der chloracetylierte PNA-Glycylthioester **198** mit **182** umgesetzt. Der Cyclooctintransfer verlief in Anwesenheit von 0.1 Äquiv. Ras2 glatt, da die HPLC-Spuren die Signale beider PNA-Zyklen (**185** und **186**) anzeigten (Abbildung 60). Die geringere Reaktivität des Chloracetylrests verhinderte offenbar erfolgreich die Bildung des Substitutionsprodukts **201**. Allerdings verlief auch die Zyklisierung des intermediär gebildeten, linearen Transferprodukts **202** langsamer ab als bei dem zuvor untersuchten, bromacetylierten Derivat **183** (vgl. Abbildung 57). Auch in Abwesenheit des Templats kam es nun zur Bildung des zyklierten Produkts **186** aus der Akzeptorsonde, was zusammen mit den ebenfalls detektierten Verbindungen **185** und **202** für eine nicht zu vernachlässigende Hintergrund-



**Abbildung 61:** HPLC-Spuren der Transfer-Zyklisierungsreaktion des chloracetylierten PNA-βAla-ALO-Thioesters **199** mit der azidmodifizierten Cysteinyln-PNA **182** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden, ggf. 0.1  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20  $\mu$ M TCEP, pH 7.0,  $T = 30^\circ\text{C}$ , HPLC: Gradient 7,  $\lambda = 260$  nm). \* Es wurden beide Regioisomeren von **204** gebildet.

reaktion sprach. Offensichtlich hatte zuvor die konkurrierende Bildung des Verknüpfungsprodukts **192** einen templatunabhängigen Cyclooctintransfer vom reaktiveren Glycylthioester auf **182** verhindert. **192** schien ebenfalls eine Inhibierung der templatkatalysierten Reaktion zu bewirken, denn der Transfer war für die Reaktion **198** + **182** bereits nach 3 h abgeschlossen, während die Umsetzung **181** + **182** 7 h in Anspruch nahm. Zuletzt erfolgte die Untersuchung der Reaktion des chloracetylierten PNA- $\beta$ Alanylthioesters **199** mit **182**. Die verminderten Reaktivitäten sowohl des Halogenacetylrests als auch der Thioestergruppe in **199** ließen über einen Zeitraum von 7 h nahezu keine templatunabhängigen Reaktionen wie Hydrolyse oder Hintergrundtransfer mehr zu (Abbildung 61). Der templatgesteuerte Transfer war etwas langsamer als im Fall des chloracetylierten Glycylthioesters **198**, da die Reaktion nach 3 h noch nicht beendet war. Die Signale der beiden Regioisomeren des PNA-Zyklus **204** konnten durch die chromatografische Trennung nicht mehr aufgelöst werden, da die  $\beta$ Alanyl-einheit in **204** offenbar zu einer Angleichung der Retentionszeiten führte.

Die Reaktion von **199** mit **182** wurde anschließend hinsichtlich des Einflusses der Temperatur auf die Zyklisierungsrate untersucht. Insbesondere die Zyklisierung des aus dem Thioester **199** gebildeten, linearen Transferprodukts **202** verlief bei 35 °C wesentlich schneller als bei 30 °C, wie aus den HPLC-Spuren hervorging (Abbildung 62a, b). Während bei 30 °C erst nach 3 h ungefähr gleiche Mengen an **202** (39%) und dem zyklischen Produkt **185** (41%)



**Abbildung 62:** a), b) HPLC-Spuren der Transfer-Zyklisierungsreaktion des chloracetylierten PNA- $\beta$ Ala-ALO-Thioesters **199** mit der azidmodifizierten Cysteinyl-PNA **182** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat bei a) 30 °C bzw. b) 35 °C. c) MALDI/TOF-Massenspektrum der Reaktion nach 5 h in Gegenwart von 0.1 Äquiv. Ras2 bei 35 °C (1  $\mu$ M Sonden, ggf. 0.1  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20  $\mu$ M TCEP, pH 7.0,  $T$  = 30 °C, HPLC: Gradient 7,  $\lambda$  = 260 nm). \* Es wurden beide Regioisomeren von **204** gebildet.

vorlagen, war dies bei 35 °C bereits nach 2 h der Fall (34% **202** + 39% **185**). Die Bildung des zweiten Zyklus **204** war bei beiden Temperaturen schnell, da das lineare Intermediat **203** nicht detektiert wurde. Die Hintergrundreaktion sowie die Hydrolyse des Thioesters lieferten bei 35 °C über einen Zeitraum von 5 h eine Gesamtausbeute von 6% (**202** + **185**), die nur unwesentlich größer war als bei 30 °C (5%).

Die templatgesteuerte Reaktion wurde ebenfalls mittels MALDI/TOF-MS analysiert. Nach fünfstündiger Umsetzung lagen im Massenspektrum neben den Signalen der beiden PNA-Zyklen ( $m/z_{th.} = 2428$  (**204**) bzw. 2742 (**185**)), des linearen Produkts **202** ( $m/z_{th.} = 2778$ ) und der nicht umgesetzten Eduktsonden ( $m/z_{th.} = 2193$  (**182**) bzw. 3013 (**199**)) auch noch die Signale von zwei weiteren Verbindungen vor (Abbildung 62c). Eines könnte dem Transferprodukt der Akzeptorsonde **182** entsprechen, die zuvor durch das im Puffer enthaltene Phosphin zum Amin reduziert wurde ( $m/z_{th.} = 2402$ ). Das zweite Signal gehört vermutlich zu einer aus dem linearen Transferprodukt **203** gebildeten Spezies, die eine zweite  $\beta$ Alanyl-cyclooctineinheit als Thioester gebunden trägt ( $m/z_{th.} = 2664$ ). Letztere würde durch eine benachbarte Hybridisierung von **199** und **203** und anschließenden Cyclooctintransfer auf die Thiolfunktion des Cysteins entstehen.

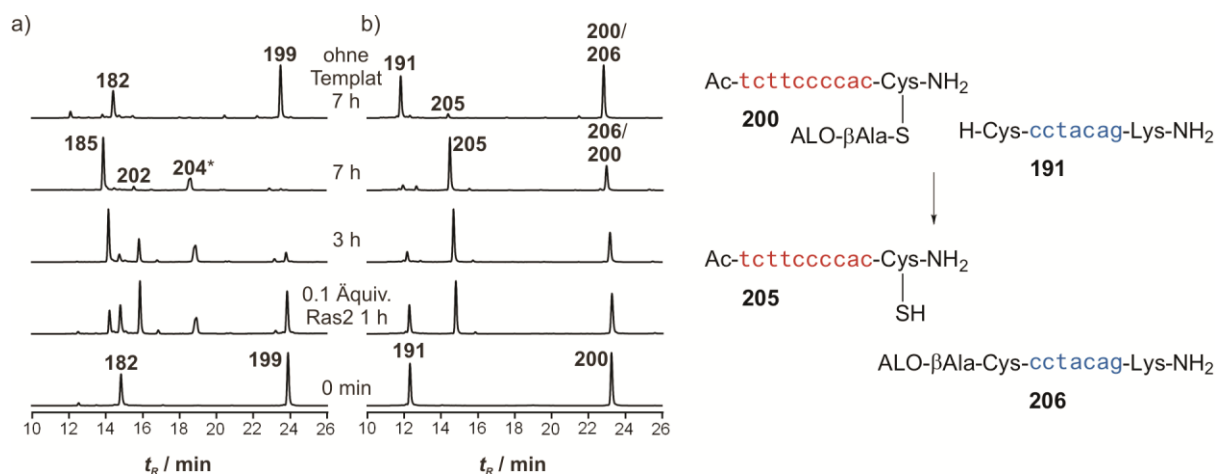
### 4.4.3 Vergleich der Transfer-Zyklisierungsreaktion mit der Transferreaktion ohne Zyklisierung

Die bisherigen Resultate bestätigten, dass die templatkontrollierten Transfer-Zyklisierungsreaktionen mit *turnover* abliefen. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die Zyklisierung der Transferprodukte auf die katalytische Aktivität des Templats hat. Hierzu wurden verschiedene halogenacetylierte Cyclooctinthioester mit der azidmodifizierten Cysteiny-PNA **182** umgesetzt. Parallel dazu erfolgten Reaktionen der entsprechenden acetylierten Cyclooctinthioester mit der nicht azidfunktionalisierten Cysteiny-PNA **191**.

Zunächst wurde wieder die Umsetzung des chloracetylierten PNA- $\beta$ Alanylthioesters **199** mit **182** untersucht. In Gegenwart von 0.1 Äquiv. des Templats zeigten die HPLC-Spuren die Signale des linearen Intermediats **202** sowie der beiden zyklischen Produkte **185** und **204**, welche zeitabhängig gebildet wurden (Abbildung 63a). In den Chromatogrammen der Kontrollreaktion ohne Produktzyklisierung (**200** + **191**) war dagegen nur ein neues Signal zu erkennen. Dieses wurde über den Vergleich der Absorptionsmaxima dem Transferprodukt **205** zugeordnet (Abbildung 63b). Das zweite Produkt (**206**), welches den Cyclooctinrest trägt, koeluierte mit der ebenfalls cyclooctinmodifizierten Überträger-sonde **200**. Eine MALDI/TOF-

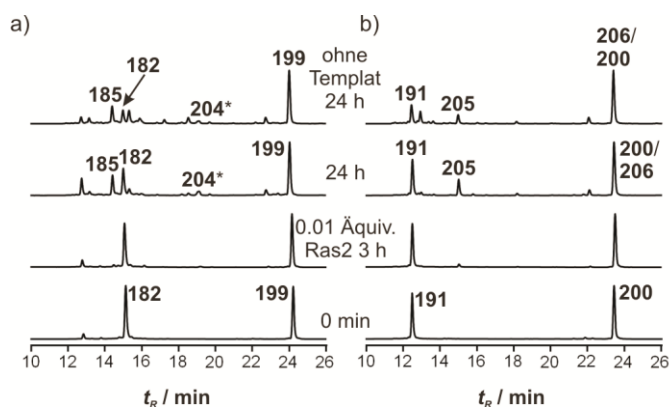


#### 4.4 DNA-templatgesteuerte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen



**Abbildung 63:** HPLC-Spuren der a) Transfer-Zyklisierungsreaktion des chloracetylierten PNA-βAla-ALO-Thioesters **199** mit der azidmodifizierten Cysteiny-PNA **182** sowie der b) Transferreaktion des acetylierten PNA-βAla-ALO-Thioesters **200** mit der nicht azidfunktionalisierten Cysteiny-PNA **191** in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat (1 μM Sonden, ggf. 0.1 μM DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20 μM TCEP, pH 7.0,  $T = 35^\circ\text{C}$ , HPLC: Gradient 7,  $\lambda = 260\text{ nm}$ ). \* Es wurden beide Regioisomeren von **204** gebildet.

MS-Analyse bestätigte die Bildung beider linearen Transferprodukte. Die Koelution der PNA-Sonden **206** und **200** gestaltete die Ausbeutebestimmung der Kontrollreaktion schwierig. Innerhalb eines Laufs konnten die Integrale unter den Signalen eines Produkt-Eduktpaars nicht mehr ermittelt werden. Daher wurde als Referenz die Fläche unter dem Signal der Überträger-sonde **200** aus dem Lauf vor Zugabe des Templats (0 min) genutzt. Dies erhöhte zwar den Fehler der ermittelten Ausbeuten, stellte aber mit den gegebenen Sonden die einzige Möglichkeit zur Quantifizierung der Reaktion dar. Die gleiche Vorgehensweise wurde ebenfalls für das Sondenpaar **199**→**202/185** angewendet. Die Gesamtausbeute an zyklischem und linearem Produkt (**202** + **185**) war nach 1 h in Gegenwart von 0.1 Äquiv. Ras2 identisch mit der des nicht zur Zyklisierung befähigten Produkts **205** (jeweils 55%). Da zu diesem Zeitpunkt auch bei der Transfer-Zyklisierungsreaktion das lineare Produkt dominierte (38% **202**, 17% **185**), war mit etwaigen Unterschieden erst nach längerer Reaktionsdauer zu rechnen. Nach 3 h bzw. 7 h überstieg die Ausbeute der Transfer-Zyklisierungsreaktion die der Transferreaktion um 11% bzw. 14% (83% bzw. 91% **185** + **202**, 72% bzw. 77% **205**). Diese Werte dürfen aufgrund des zur Quantifizierung benutzten Integrationsverfahrens jedoch nur als Richtwerte angesehen werden. In Abwesenheit des Templats waren beide Reaktionen ineffektiv (5–6% Ausbeute nach 7 h). Bei einer Verringerung der Templatkonzentration auf 0.01 Äquiv. (10 nM) blieb eine Beschleunigung der Reaktion durch die Produktzyklisierung aus. Vielmehr zeigte die HPLC-Spur nach 24 h die Bildung von mehreren Nebenprodukten

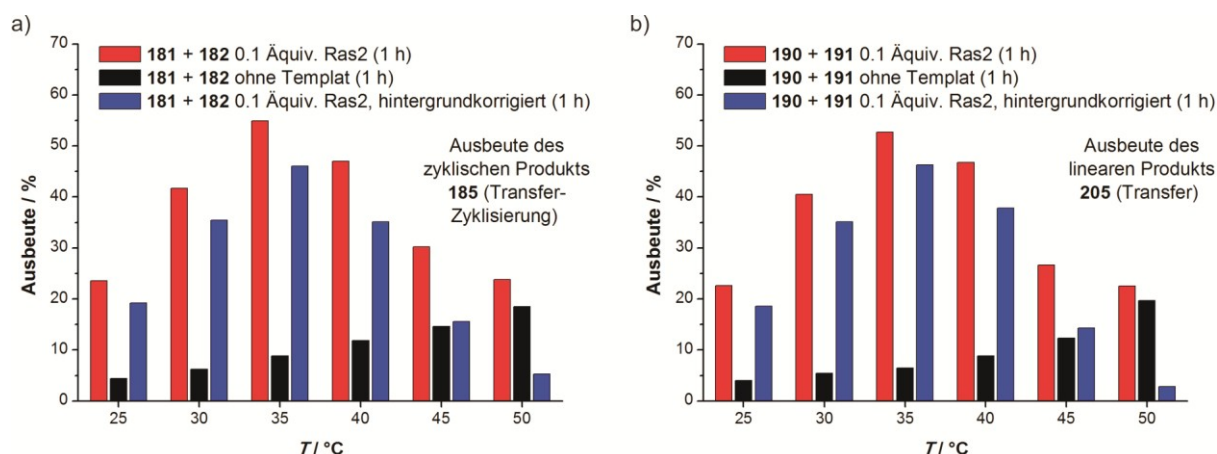


**Abbildung 64:** HPLC-Spuren der a) Transfer-Zyklisierungsreaktion des chloracetylierten PNA- $\beta$ Ala-ALO-Thioesters **199** mit der azidmodifizierten Cysteinyl-PNA **182** sowie der b) Transferreaktion des acetylierten PNA- $\beta$ Ala-ALO-Thioesters **200** mit der nicht azidfunktionalisierten Cysteinyl-PNA **191** in Gegenwart von 0.01 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat (1  $\mu$ M Sonden, ggf. 0.01  $\mu$ M DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20  $\mu$ M TCEP, pH 7.0,  $T = 35^\circ\text{C}$ , HPLC: Gradient 7,  $\lambda = 260\text{ nm}$ ). \* Es wurden beide Regioisomeren von **204** gebildet.

an. Außerdem verschwand das Signal der azidmodifizierten Cysteinyl-PNA **182**, ohne dass es in gleichem Maße zur Bildung des entsprechenden Zyklus **204** kam (Abbildung 64). Eventuell adsorbierte **182** über die langen Reaktionszeiten am Reaktionsgefäß oder präzipitierte im Puffer.

Schnellere Transfer- und Zyklisierungsreaktionen können mit dem reaktiveren, brom-acetylierten PNA-Glycylthioester **181** erzielt werden. Da hier die Bildung des Verknüpfungsprodukts **192** mit der Cysteinyl-PNA **182** über eine Thiol $\rightarrow$ Bromid-Substitution problematisch war (vgl. Abbildung 57), wurde die Konzentration der Reaktanden auf 250 nM verringert. Eine Templatkonzentration von 0.1 Äquiv. (25 nM) sollte außerdem eine raschere Reaktion sicherstellen. Die Ausbeute des zyklischen Produkts **185** wurde nach 1 h Reaktionszeit mit der des linearen Produkts **205** verglichen, welches aus der Umsetzung des acetylierten PNA-Glycylthioesters **190** mit **191** hervorging (Abbildung 65). Zudem wurde die Reaktionstemperatur zwischen  $25^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$  variiert. In Abwesenheit des Templats nahmen die Ausbeuten beider Reaktionen mit steigender Temperatur von 4% bei  $25^\circ\text{C}$  auf 19–20% bei  $50^\circ\text{C}$  zu. Da keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, führten die zusätzlichen Reaktivitäten in den PNA-Konjugaten **181** und **182** unter diesen Bedingungen nicht zu einer Beschleunigung der Hintergrundreaktion. Die niedrigere Sondenkonzentration verhinderte ebenfalls die Bildung des Verknüpfungsprodukts **192**. In Gegenwart des Templats nahmen die Ausbeuten bei einer Temperaturerhöhung von  $25^\circ\text{C}$  auf  $35^\circ\text{C}$  von 23–24% auf 53–55% zu. Temperaturen nahe der Schmelztemperatur des Sonden-Templat-Komplexes beschleunigen

## 4.4 DNA-templatgesteuerte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen

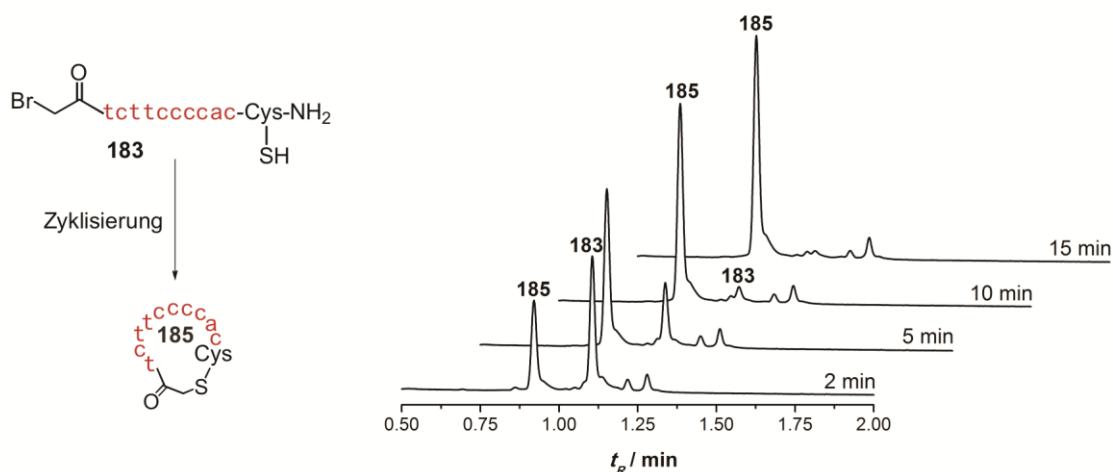


**Abbildung 65:** Ausbeuten nach 1 h Reaktion bei verschiedenen Temperaturen in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 sowie ohne Templat. a) Zyklisches Produkt **185** aus der Transfer-Zyklisierungsreaktion des bromacetylierten PNA-Gly-ALO-Thioesters **181** mit der azidmodifizierte Cys-PNA **182**. b) Lineares Produkt **205** aus der Transferreaktion des acetylierten PNA-Gly-ALO-Thioesters **190** mit der nicht azidfunktionalisierten Cys-PNA **191** (250 nM Sonden, ggf. 25 nM DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20 µM TCEP, pH 7.0).

den dynamischen Strangaustausch zwischen templatgebundenen Produkten und ungebundenen Reaktanden und verstärken so den *turnover*. Eine weitere Erhöhung der Temperatur führte wieder zu einer Verminderung der Ausbeuten von 47% bei 40 °C auf 23–24% bei 50 °C, da jenseits der Schmelztemperatur immer geringere Mengen der reaktiven, ternären Komplexe vorliegen. Dies spiegelte sich in den hintergrundkorrigierten Ausbeuten wieder, die für beide Umsetzungen bei 35 °C ihr Maximum durchliefen (46%) und bei 50 °C am geringsten waren (3–5%). Bei allen untersuchten Temperaturen, außer bei 50 °C, verliefen die Umsetzungen mit *turnover*. Allerdings konnte mit den reaktiveren, bromacetylierten PNA-Glycylthioestern kein positiver Effekt der Produktzyklisierung auf die nach 1 h erzielten Ausbeuten nachgewiesen werden.

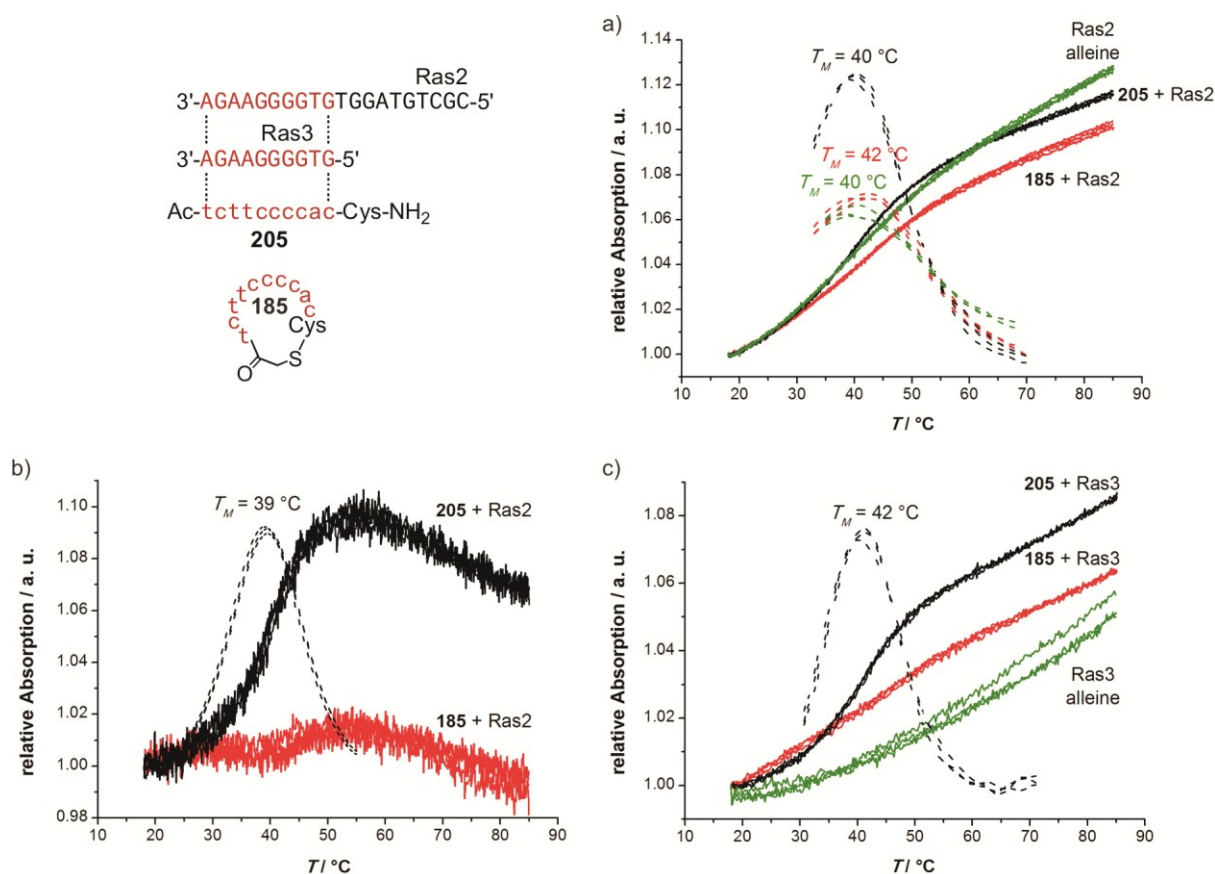
### 4.4.4 Templataffinitäten der linearen und zyklischen Reaktionsprodukte

Um sowohl die Templataffinität des linearen, acetylierten Produkts **205** als auch die des durch die intramolekulare Thiol→Halogenid-Substitution gebildeten, zyklischen Produkts **185** zu ermitteln, wurde **205** und das bromacetylierte Vorläuferkonjugat **183** mittels Festphasensynthese hergestellt. Die Ausbeuten betrugen jeweils 13%. Eine UPLC®-Analyse zeigte, dass **183** in Puffer rasch das zyklische Konjugat **185** bildete, welches nach 15 min quantitativ vorlag (Abbildung 66). Anschließend wurden Schmelzkurven beider Transferprodukte mit dem DNA-Templat Ras2 aufgenommen. Der  $T_M$  des Duplexes aus dem linearen Konjugat **205**



**Abbildung 66:** UPLC®-Spuren der Zyklisierungsreaktion des bromoacetylierten PNA-Konjugats **183** (10  $\mu$ M PNA, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.0,  $T = 25^\circ\text{C}$ , UPLC®: Gradient 12,  $\lambda = 260$  nm).

und Ras2 betrug  $40^\circ\text{C}$  (Abbildung 67a). Überraschenderweise wurde für den Komplex aus dem zyklischen Produkt **185** und Ras2 ein leicht erhöhter  $T_M$  von  $42^\circ\text{C}$  ermittelt. Ein Kontrollexperiment, in dem die temperaturabhängige Absorption des DNA-Templats ohne eine komplementäre PNA gemessen wurde, ergab jedoch einen ähnlich sigmoidalen Kurvenverlauf wie in Anwesenheit der PNA-Konjugate. Anscheinend unterlag das Templat selbst inter- oder intramolekularen Wechselwirkungen, die bei niedrigen Temperaturen zur Ausbildung von definierten Sekundärstrukturen führten. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Schmelzkurven der PNA•DNA-Duplexe tatsächlich deren Dissoziation wiedergaben, wurde die Absorption des Templats im Einzelstrang von der für die Duplexe gemessenen subtrahiert (Abbildung 67b). Die so erhaltenen Kurven zeigten für den Duplex aus dem linearen Transferprodukt **205** und Ras2 einen weiterhin sigmoidalen Verlauf an. Der daraus berechnete „ $T_M$ “ von  $39^\circ\text{C}$  unterschied sich von dem zuvor ermittelten nur unwesentlich. Im Gegensatz dazu änderte sich die durch Subtraktion berechnete Absorptionskurve der äquimolaren Mischung aus dem PNA-Zyklus **185** und Ras2 fast nicht mehr mit der Temperatur. Dadurch wird impliziert, dass die in Abbildung 67a gemessenen Kurven für den Komplex **185**•Ras2 und für Ras2 ohne komplementäre PNA beide das Verhalten des einzelsträngigen Templats beschreiben. Die für den Duplex **205**•Ras2 aufgenommene Kurve resultiert dagegen zumindest teilweise aus der Dissoziation des Duplexes **205**•Ras2. Dieses Resultat spricht für eine stark verminderte Affinität des zyklischen Transferprodukts **185** zum DNA-Templat. Durch Denaturierungsexperimente mit der verkürzten DNA Ras3, deren Sequenz die gleiche Länge wie die der Transferprodukte hatte, konnte diese Annahme bestätigt werden (Abbildung 67c). Während der  $T_M$  des Duplexes **205**•Ras3 zu  $42^\circ\text{C}$



**Abbildung 67:** Schmelzkurven (—) des zyklischen Transferprodukts **185** und des linearen Transferprodukts **205** a) mit dem langen DNA-Templat Ras2 sowie von Ras2 als Einzelstrang, b) mit dem langen DNA-Templat Ras2 nach Subtraktion der Kurve von einzelsträngigem Ras2 sowie c) mit dem kurzen DNA-Templat Ras3. Für die sigmoidalen Kurven sind die ersten Ableitungen dargestellt (- - -) (1  $\mu$ M PNA-Konjugat und DNA-Templat, 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 20  $\mu$ M TCEP, pH = 7.0,  $\lambda$  = 260 nm).

bestimmt wurde, wurden für einzelsträngiges Ras3 sowie für den Zyklus **185** in Gegenwart von Ras3 keine sigmoidalen Absorptionskurven erhalten.

#### 4.4.5 Diskussion

Die vorgestellte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktion kombiniert das Konzept der Zyklisierung von Produkten aus templatgesteuerten Reaktionen mit einem Reaktionsformat, welches nicht zu einer Verlängerung der Reaktionsprodukte führt. Damit bestand erstmals die Möglichkeit zur templatgesteuerten Synthese von Molekülen mit geringeren Templat-affinitäten als die der Reaktanden. Das DNA-Templat leitete dabei drei aufeinanderfolgende chemische Reaktionen ein, die zur Bildung von zwei zyklischen Produkten in einer homogenen Eintopfprozedur führten. Dieser komplexe, DNA-programmierte Prozess konnte durch die verwendete Chemie in hohem Maße kontrolliert werden.

Die dafür benötigten halogenacetylierten PNA-Cyclooctinthioester wurden über einen kombinierten Ansatz aus Festphasensynthese und finaler Funktionalisierung in Lösung hergestellt. Das Cyclooctinderivat fungierte zunächst als Schutzgruppe für die Thiofunktionalität des Cysteins, welches den Thioester aufbaut. Dadurch wurde eine Zyklisierung der Eduktsonden verhindert. Gleichzeitig diente es als Acylsegment, welches in einer templatkontrollierten Reaktion auf die azidmodifizierte Cysteinyl-PNA **182** transferiert wurde. Nach erfolgtem Cyclooctintransfer besaßen beide primär gebildeten linearen Produkte die für eine intramolekulare Zyklisierung notwendigen funktionellen Gruppen. Die (3+2)-Cycloaddition des Azids mit dem Cyclooctin verlief unter Bedingungen des dynamischen Strangaustauschs rasch, sodass das lineare Intermediat nicht mittels HPLC detektiert werden konnte. Das gleiche galt für die Zyklisierung von linearen Produkten aus bromacetylierten PNA-Thioestern. Problematisch war jedoch die konkurrierende Verknüpfung der Eduktsonden durch die intermolekulare Thiol→Halogenid-Substitution. Die verminderte Elektrophilie des chloracetylierten PNA- $\beta$ Alanylthioester **199** blockierte diesen Reaktionspfad. Zusätzlich konnte so die Hydrolyseempfindlichkeit und der templatunabhängige Transfer zurückgedrängt werden.

Die Produktzyklisierung hatte bei der Verwendung des Thioesters **199** einen positiven Effekt auf die Produktausbeuten in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats. Dieser stellte sich jedoch erst ein, wenn die Zyklisierung des linearen Zwischenprodukts aus der Überträger-sonde vorangeschritten war und deutlich mehr als 50% Gesamtausbeute vorlagen. So lieferte die Transfer-Zyklisierungsreaktion nach 3 h bzw. 7 h 11% bzw. 14% mehr Ausbeute als eine Transferreaktion ohne Zyklisierung. Der reaktivere bromacetylierte Glycylthioester **181** konnte dagegen nach 1 h Reaktionszeit den *turnover* nicht signifikant steigern (55% Ausbeute im Vergleich zu 53% Ausbeute ohne Zyklisierung). Bei längeren Reaktionszeiten (24 h) kam es zudem auch bei Verwendung des weniger reaktiven PNA-Thioesters zur vermehrten Bildung von Nebenprodukten. Dieser Nachteil ist in der simultanen Anwesenheit von fünf verschiedenen funktionellen Gruppen begründet und zeigt die Grenzen des Konzepts auf.

Denaturierungsexperimente attestierten dem zyklischen Transferprodukt **185** im Vergleich zu seinem linearen Pendant **205** eine deutlich verminderte Templataffinität (**205**•Ras3:  $T_M = 42\text{ °C}$ , **186**•Ras3: keine sigmoidale Schmelzkurve). Die Steigerung der katalytischen Aktivität des Templats setzte allerdings erst ein, wenn die Produktinhibierung durch einen mehr als 50%igen Umsatz schon stark zum Tragen kam. Die Zyklisierung sollte aufgrund der Rigidität des Produktduplexes nur nach der Dissoziation der linearen Produkte vom Templat

erfolgen. Die Dissoziationsrate der primär gebildeten Produkte bleibt also unverändert. Die templatkatalysierte Reaktion zeichnete sich daher erst dann durch einen höheren *turnover* aus, wenn die Assoziation der gebildeten Produkte den Umsatz am Templat entscheidend inhibierte. Demnach wären große Steigerungen in der katalytischen Templataktivität Reaktionen vorbehalten, bei denen schon die primär gebildeten Produkte deutlich höhere Dissoziationsraten besitzen. Dies würde zum Beispiel bei templatgesteuerten Nukleinsäurefragmentierungsreaktionen der Fall sein.

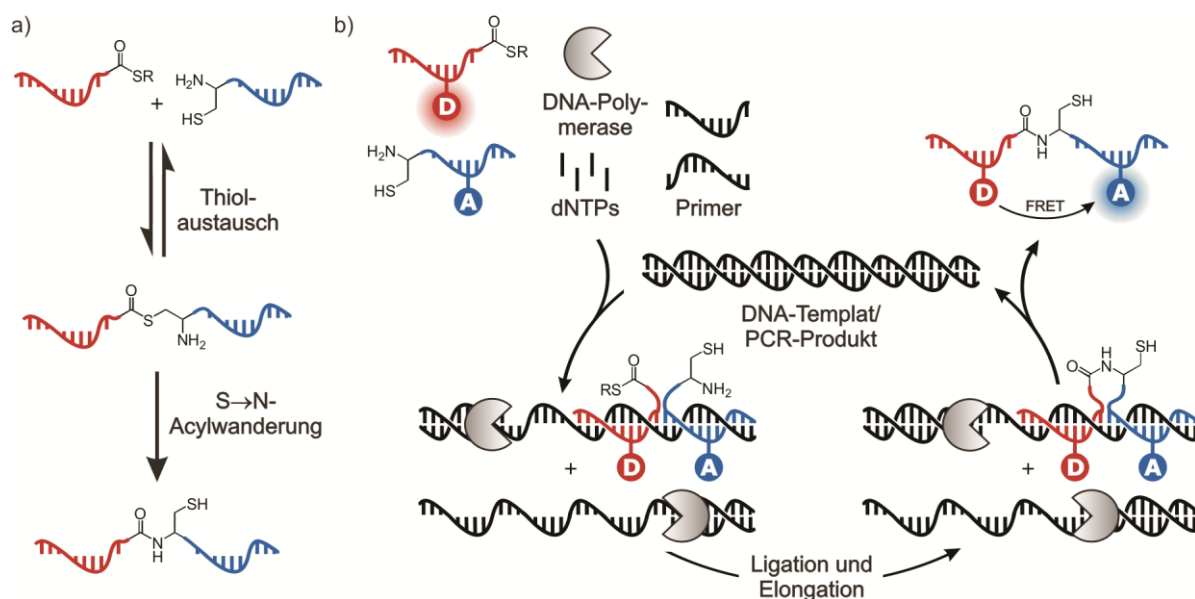
## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung

Reaktionen zwischen chemisch funktionalisierten Oligonukleotiden, die in niedriger Konzentration vorliegen und erst durch komplementäre Nukleinsäuretemplate in hoher effektiver Molarität angeordnet werden, haben in jüngerer Zeit an Bedeutung gewonnen.<sup>[117,267–272]</sup> Besonders auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik zeichnen sich templatgesteuerte Reaktionen gegenüber Methoden, die allein auf der Hybridisierung von Oligonukleotiden beruhen, durch zwei wesentliche Vorteile aus. Zum einen können kürzere Nukleinsäuresonden eingesetzt werden. Da für eine erfolgreiche Umsetzung immer zwei reaktive Sonden benachbart hybridisieren müssen, bleibt die Spezifität für den zu detektierenden Sequenzausschnitt erhalten. Durch die verminderte Länge ist jedoch die Hybridisierungsspezifität gegenüber Einzelbasenfehlpaarungen innerhalb der Zielsequenz deutlich größer. Zum anderen besteht die Möglichkeit der Erzeugung mehrerer Signalmoleküle pro Nukleinsäuretemplat (*turnover*).<sup>[118,119]</sup> Im Vergleich zu Hybridisierungssonden bleibt das durch die Reaktionsprodukte erzeugte Signal auch nach der Dissoziation vom Templat erhalten. Daher können templatgesteuerte Umsetzungen von der katalytischen Aktivität des Nukleinsäuretemplats profitieren.

Von den heute bekannten, mannigfaltigen Reaktionstypen wurden zuerst Verknüpfungsreaktionen untersucht. Die aus (bio)chemischen Konjugationsmethoden bekannten Ligationstrategien lassen sich relativ unkompliziert in ein für die nukleinsäurekontrollierte Verknüpfung kompatibles Format integrieren. So wurde im Arbeitskreis Seitz eine auf der nativen chemischen Verknüpfung (NCL) basierende Methode für die Ligation von 1,2-aminothioolfunktionalisierten Peptidnukleinsäuren (PNAs) und PNA-Thioesterkonjugaten an DNA-Templaten entwickelt (Abbildung 68a).<sup>[65,170,171,173,175,273]</sup> Die Reaktion zeichnet sich durch eine hohe Einzelbasenspezifität aus. Problematisch ist jedoch die bei Verknüpfungsreaktionen generell stark ausgeprägte Produktinhibierung. Aufgrund der Länge der gebildeten Ligationsprodukte binden diese das Templat mit hoher Affinität und schränken dessen katalytische Aktivität ein.



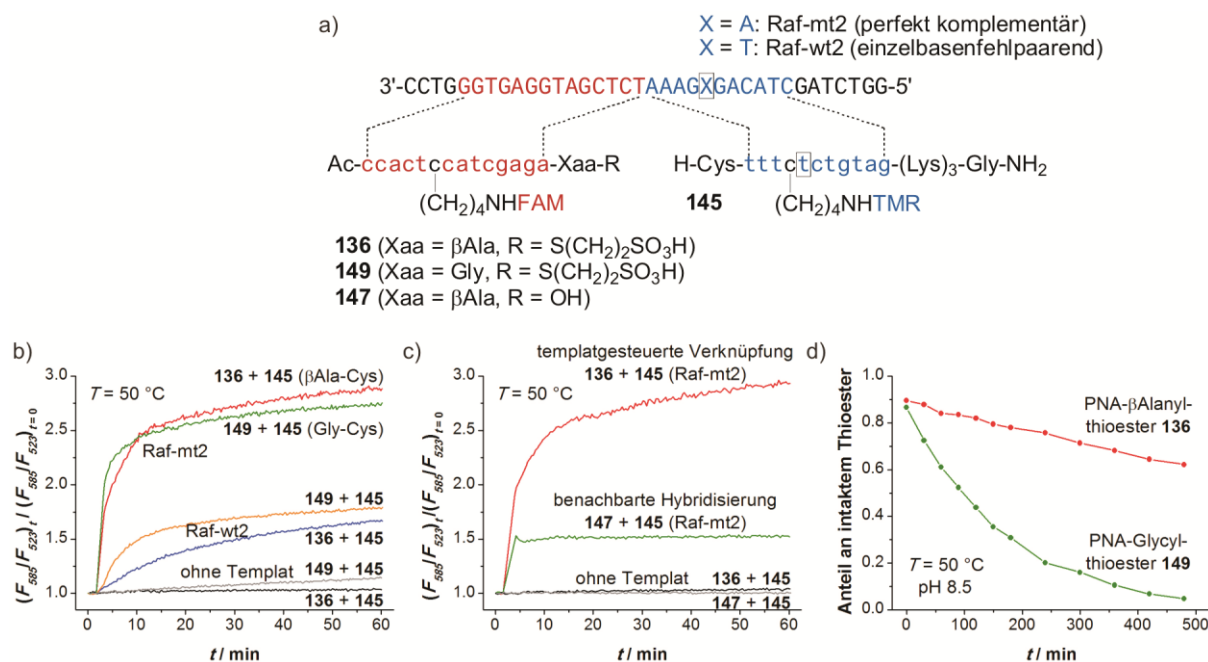


**Abbildung 68:** a) Prinzip der nativen chemischen PNA-Verknüpfung eines PNA-Thioesters mit einer Cysteinyl-PNA. b) DNA-templatgesteuerte native chemische PNA-Verknüpfung während der PCR mit Echtzeitdetektion des Verknüpfungsprodukts mittels Fluorometrie.

Eine Möglichkeit, die Produktinhibierung zu umgehen, bietet die Kombination einer DNA-vermittelten Verknüpfungsreaktion mit einer enzymatischen Amplifizierung des DNA-Templats durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).<sup>[274,275]</sup> Das während der PCR ständig vervielfältigte Amplicon kann dabei die Verknüpfungsreaktion der reaktiven PNA-Konjugate auslösen (Abbildung 68b). Um die Bildung der Verknüpfungsprodukte mittels Fluorometrie verfolgen zu können, wurden die Sonden mit geeigneten Donor- und Akzeptorfluorophoren markiert. Deren räumliche Nähe im Ligationsprodukt induziert einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Wird nur der Donorfarbstoff angeregt, bewirkt der FRET eine Abnahme der Donorfluoreszenz bei gleichzeitiger Zunahme der Akzeptoremission.

Die fluorogene PNA-Verknüpfung der mit den Fluorophoren 6-Carboxyfluorescein (FAM) und 6-Carboxytetramethylrhodamin (TMR) markierten PNA-Konjugate wurde zunächst an einem einzelsträngigen DNA-Templat getestet (Abbildung 69a). Bei einer Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  und einer Temperatur von  $50\ ^\circ\text{C}$  verliefen die Umsetzungen der beiden PNA-Thioester **136** und **149** mit der Cysteinyl-PNA **145** am komplementären Templat Raf-mt2 nahezu gleich schnell. Dagegen war die templatunabhängige Verknüpfung des weniger elektrophilen  $\beta$ Alanylthioesters **136** 5.9-fach langsamer als die des Glycylthioesters **149** (Abbildung 69b). Auch in Gegenwart des einzelbasenfehlpaarenden Templats Raf-wt2 fiel die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion **136** + **145** deutlich geringer aus. Im Vergleich zur templat-vermittelten Reaktion resultierte die benachbarte Hybridisierung der nicht zur Verknüpfung

## 5.1. Zusammenfassung

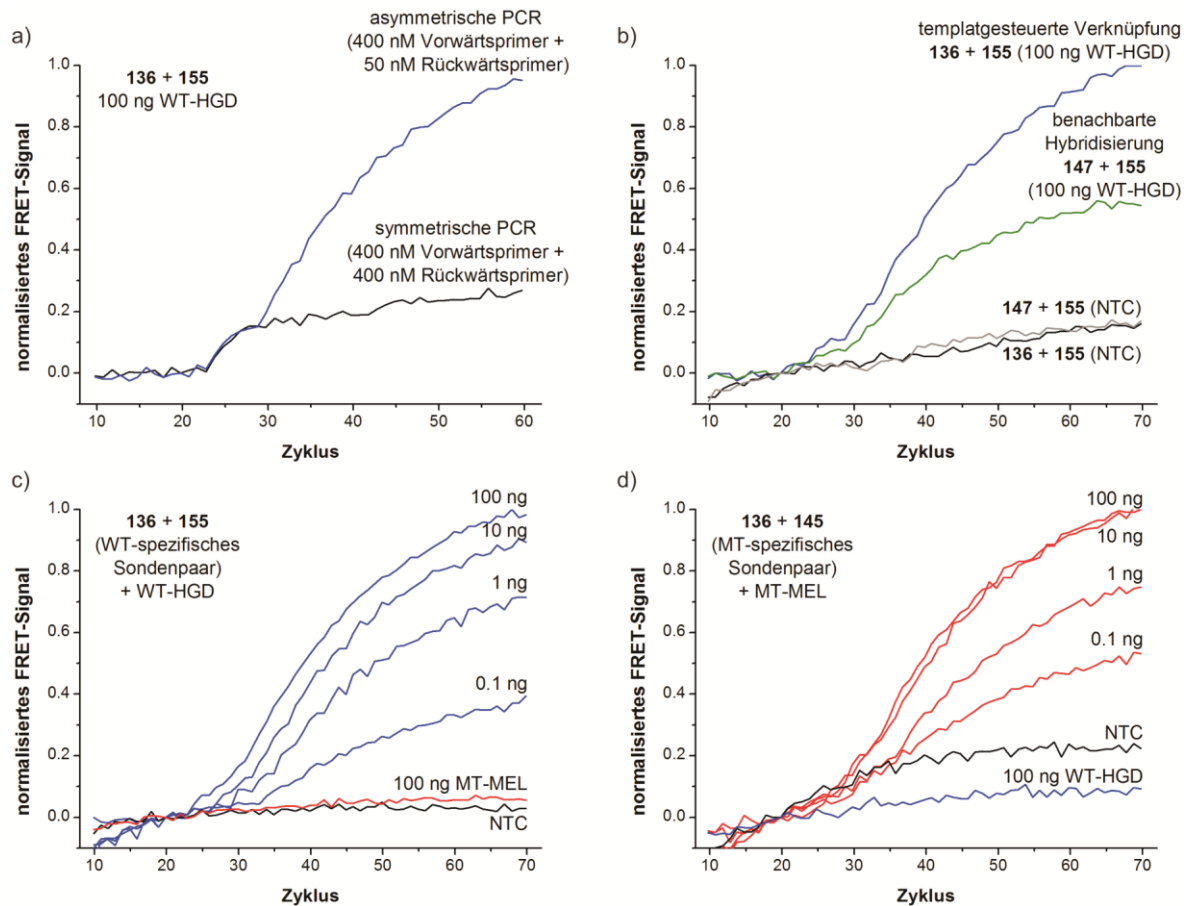


**Abbildung 69:** a) Die FAM-markierten PNA-Thioester **136** bzw. **149** sowie die nicht zur Reaktion befähigte PNA-Carbonsäure **147** hybridisieren neben der TMR-markierten Cys-PNA **145** am DNA-Templat. b), c) Relative Änderung des FRET-Signals bei der Umsetzung von b) **136** oder **149** mit **145** in Gegenwart der Template Raf-mt2, Raf-wt2 sowie ohne Templat und von c) **136** oder **147** mit **145** in Gegenwart von Raf-mt2 sowie ohne Templat. d) Hydrolysebeständigkeit der PNA-Thioester **136** und **149**.

befähigten PNA-Carbonsäure **147** und **145** in einem 3.6-fach verminderten Signalanstieg. Dies belegte den Vorteil der chemischen Fixierung der benachbarten Fluorophore im Verknüpfungsprodukt (Abbildung 69c). Der βAlanylthioester **136** zeichnete sich außerdem unter Bedingungen, welche die Hydrolyse forcierten ( $T = 50\text{ °C}$ , pH 8.5), durch eine im Vergleich zum Glycylthioester **149** 5.5-fach reduzierte Hydrolysegeschwindigkeit aus (Abbildung 69d). Diese Eigenschaften empfahlen den PNA-βAlanylthioester **136** für den Einsatz in der PCR, denn die dort vorherrschenden hohen Temperaturen begünstigen sowohl die Hydrolyse als auch die templatunabhängige Hintergrundreaktion.

Die native chemische PNA-Verknüpfung wurde anschließend während der Amplifizierung von humaner, genomischer DNA verfolgt. Dabei wurde ein Segment des B-Raf-Gens vervielfältigt, welches die Position der karzinogenen V600E-Punktmutation enthielt. Die chemische Verknüpfung von **136** mit der zur Wildtyp-DNA WT-HGD komplementären Cysteinyl-PNA **155** löste bei einer PCR mit 100 ng WT-HGD und äquimolaren Primerkonzentrationen einen leichten Anstieg des FRET-Signals aus. Dieses erreichte jedoch schon früh ein Plateau bei niedriger Intensität (Abbildung 70a). Vermutlich verhinderte die mit zunehmender Konzentration favorisierte Rehybridisierung des doppelsträngigen PCR-Produkts die Ausbildung

## 5.1. Zusammenfassung



**Abbildung 70:** Normalisiertes FRET-Signal für die Umsetzung verschiedener Sondenpaare während der PCR. a) PNA- $\beta$ Ala-Thioester **136** + Cys-PNA **155** (wildtypspezifisch) + Wildtyp-DNA WT-HGD unter symmetrischen und asymmetrischen PCR-Bedingungen. b) Sondenpaar **136** + **155** (Verknüpfung) und Sondenpaar **147** + **155** (benachbarte Hybridisierung). c), d) **136** + **155** oder **136** + Cys-PNA **145** (mutantenspezifisch) + verschiedene Konzentrationen an WT-HGD oder einzelbasenmutierter DNA MT-MEL.

reaktiver Sonden-Templat-Komplexe. Einen Ausweg bot die Verwendung eines Überschusses des Vorwärtsprimers. Unter diesen Bedingungen, die zu einem Überschuss an einzelsträngigem PCR-Produkt führten (asymmetrische PCR), stieg das Signal auch in späteren PCR-Zyklen weiter an. Der nur halb so große Signalzuwachs, der aus der benachbarten Hybridisierung des nicht reaktiven Sondenpaars **147** + **145** resultierte, belegte auch hier den Vorteil einer chemischen Verknüpfung (Abbildung 70b). Aufgrund der hohen Chemoselektivität der NCL-basierten Reaktion wurde die Anwesenheit von Enzymen, Oligonukleotidprimern und reaktiven Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) toleriert. Die native chemische PNA-Verknüpfung stellt damit die erste chemische Reaktion dar, die während einer PCR abläuft.

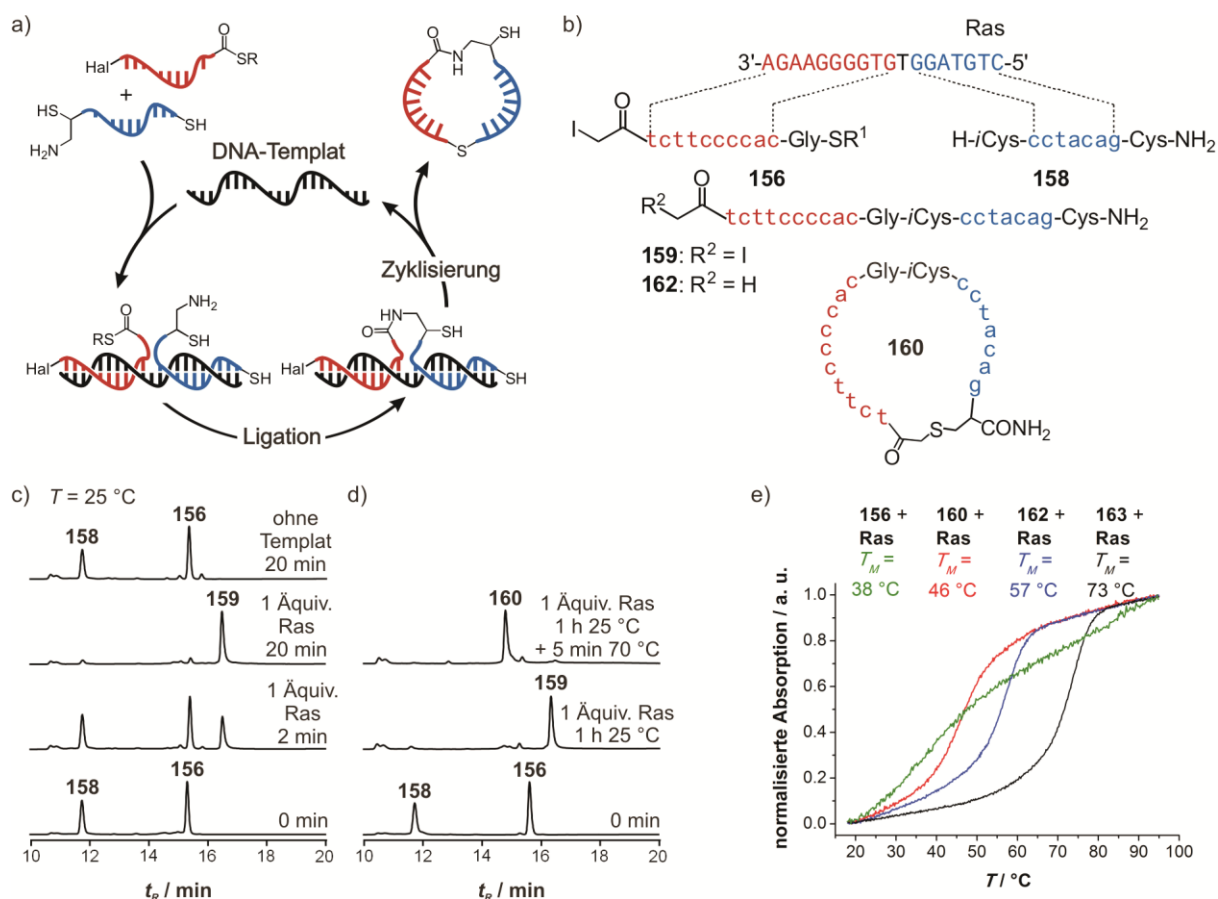
Templatverdünnungsreihen zeigten, dass sowohl das wildtypspezifische Sondenpaar **136 + 155** als auch das für die einzelbasenmutierte DNA MT-MEL spezifische Sondenpaar **136 + 145** noch ein detektierbares FRET-Signal erzeugten, wenn zu Beginn der PCR 0.1 ng der jeweils perfekt komplementären DNA zugegen waren (Abbildung 70c, d). Diese Menge entspricht einer Anzahl von ca. 30 Templatmolekülen bzw. einer Konzentration von ca. 2.5 aM. Die Nachweisgrenze war damit um etliche Größenordnungen niedriger als für bisher beschriebene templatgesteuerte Reaktionen. In beiden Fällen führten 1000-fach höhere Startmengen der einzelbasenfehlpaarenden DNAs nicht zu messbaren Signalanstiegen, was der Verknüpfungsreaktion eine exzellente Einzelbasenspezifität attestierte. Auch in Abwesenheit der Template (NTC) kam es nicht zu einer signifikanten Veränderung der FRET-Signale.

Durch die Implementierung der DNA-vermittelten PNA-Verknüpfung in die PCR konnte die hohe Einzelbasenspezifität von templatkontrollierten Reaktionen mit der hohen Empfindlichkeit enzymatischer Nukleinsäureamplifizierungsmethoden kombiniert werden. Die üblicherweise auftretende Produktinhibierung wurde so umgangen. Einem alternativen Ansatz folgend, widmete sich der zweite Teil der Arbeit der Umsetzung von neuen Strategien zur Verminderung der Produktinhibierung.

Bisherige Bemühungen, die Templataffinität von Produkten aus Verknüpfungsreaktionen zu reduzieren, basierten auf einer Erhöhung der Flexibilität an der Verknüpfungsstelle.<sup>[115,116,148,149,164,175]</sup> Eine umfassendere Destabilisierung des Produkt-Templat-Komplexes war bei einer globalen Änderung der Struktur des Verknüpfungsprodukts zu erwarten, wie sie bei einer der Ligation nachgeschalteten Zyklisierungsreaktion auftritt. Daher wurde die in Abbildung 71a dargestellte DNA-templatkatalysierte PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion untersucht.<sup>[276]</sup> Hierfür kamen am N-Terminus halogenacetylierte PNA-Glycylthioester und am C-Terminus thiolmodifizierte Isocysteiny-PNAs zum Einsatz. Das interne Gly-*i*Cys-Dipeptid in den primär gebildeten Ligationsprodukten war bereits dafür bekannt, den Produktduplex zu destabilisieren.<sup>[175]</sup> Von den über eine nachfolgende intramolekulare Thiol→Halogenid-Substitutionsreaktion gebildeten zyklischen PNAs wurde angenommen, dass sie eine deutlich verminderte Templataffinität aufweisen.<sup>[250,251]</sup> Die Produktzyklisierung könnte somit einen potentiell allgemeinen Ansatz zur Verminderung der Produktinhibierung in nukleinsäuretemplatgesteuerten Reaktionen darstellen.

Die Reaktion des iodacetylierten PNA-Thioesters **156** mit der bis-Thiol-PNA **158** (Abbildung 71b, c) lieferte bei 25 °C nach 20 min in Gegenwart stöchiometrischer Mengen des DNA-

## 5.1. Zusammenfassung

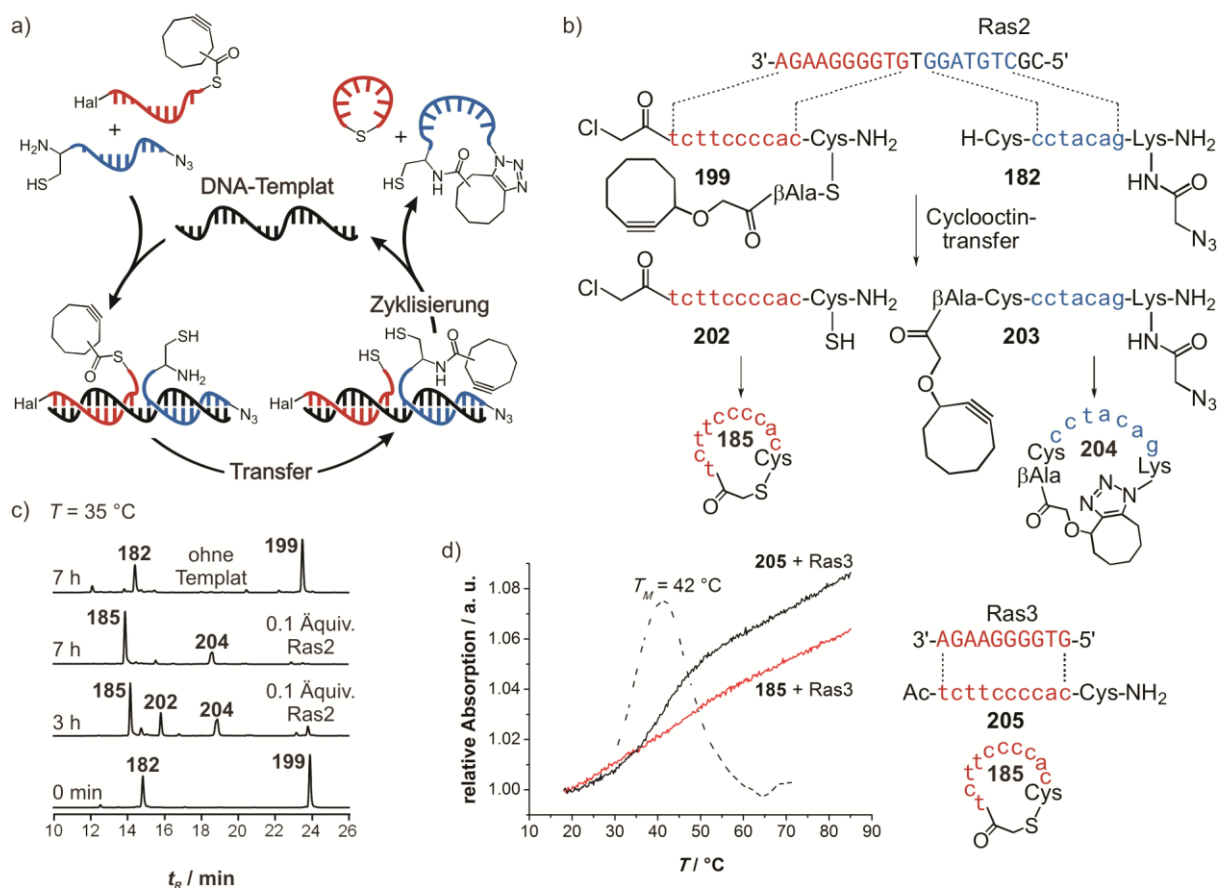


**Abbildung 71:** a) DNA-katalysierte Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion. b) Der iodacetylierte PNA-Gly-Thioester **156** hybridisiert neben der bis-Thiol-PNA **158** am DNA-Templat Ras ( $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CO-Gly-NH}_2$ ). c), d) HPLC-Spuren der Reaktion von **156** und **158**. e) Normalisierte Schmelzkurven der Komplexe aus verschiedenen PNA-Konjugaten und Ras (**163**: mit Ras durchgehend gepaarter PNA-Strang).

Templats Ras ( $1 \mu\text{M}$ ) das lineare Ligationprodukt **159** in hoher Ausbeute (86%). Offensichtlich behinderte die Rigidität des Duplexes **159**•Ras die Zyklisierung, denn nach dessen temperaturinduzierter Dissoziation entstand das zyklische Produkt **160** rasch (Abbildung 71d). Die Vorteile der Produktzyklisierung wurden in einem „Templat-Rezyklisierungsexperiment“ demonstriert. Mit einem Thermozyklierungsprotokoll erfolgte nach quantitativer Verknüpfung und anschließender Zyklisierung die Bildung von neuen Produktmolekülen, wenn frische Reaktanden zugegeben wurden. Dies belegte, dass die reaktiven PNA-Konjugate **156** und **158** in der Lage waren, mit dem PNA-Zyklus **160** um die Bindung des Templats zu konkurrieren. Denaturierungsexperimente ergaben für den Komplex **160**•Ras eine im Vergleich zum linearen Duplex **162**•Ras um  $11^\circ\text{C}$  verminderte Schmelztemperatur (Abbildung 71e). Die Kombination aus internem Gly-*i*Cys-Dipeptid und anschließender Zyklisierung induzierte sogar eine Destabilisierung um  $27^\circ\text{C}$ , wie aus der Schmelzkurve des durchgehend gepaarten Duplexes **163**•Ras hervorging.

Die Ausbeute der Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion eines verkürzten, iodacetylierten Thioesters mit **158** betrug in Anwesenheit von substöchiometrischen Templatmengen (0.25 Äquiv) unter Thermozyklisierungsbedingungen 44%. Dies war fast dreimal mehr als bei der Reaktion eines acetylierten Thioesters, deren Verknüpfungsprodukte nicht zur Zyklisierung befähigt waren (16% Ausbeute). Ähnliche Resultate wurden mit einem chloracetylierten Thioester und **158** bei höheren Sondenkonzentrationen (5  $\mu$ M) und weiter verringerten Templatmengen (0.1 bzw. 0.01 Äquiv.) erzielt. Nach 10 Thermozyklen überstiegen die hintergrundkorrigierten Ausbeuten der Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktion (23% bzw. 2%) die der Verknüpfungsreaktion ohne Zyklisierung (10% bzw. 1%) um das Doppelte. Obwohl der positive Effekt der Produktzyklisierung signifikant war, erbrachte die Reaktionssequenz für die Detektion von niedrigen nanomolaren Templatkonzentrationen keine Vorteile. Der Grund lag wahrscheinlich in der nicht ausreichend großen Verminderung der Templataffinität durch den Zyklisierungsschritt. So war die Schmelztemperatur des Komplexes **160**•Ras immer noch 8 °C höher als die des Komplexes aus der reaktiven Thioestersonde **156** und Ras (Abbildung 71e).

Im Gegensatz zu Verknüpfungsreaktionen erfahren die Produkte aus templatgesteuerten Acyltransferreaktionen *per se* keine Zunahme der Templataffinität,<sup>[188–190]</sup> da sich die Länge der involvierten Oligonukleotide nicht ändert. Durch die Entwicklung einer Transfer-Zyklisierungsreaktion bestand demnach die Möglichkeit, erstmals Reaktionsprodukte mit einer geringeren Templataffinität als die der Eduktsonden zu erhalten. Das DNA-Templat sollte dabei drei aufeinanderfolgende chemische Reaktionen in einer Eintopfprozedur einleiten (Abbildung 72a). Der chloracetylierte PNA-Thioester **199** kann nach dem templatgesteuerten Transfer der  $\beta$ Alanylcyclooctineinheit auf die azidmodifizierte Cysteinyl-PNA **182** das zyklische Produkt **185** bilden (Abbildung 72b). Die intramolekulare Thiol→Chlorid-Substitution im linearen Produkt **202** ist in der Eduktsonde **199** verhindert. Hier dient der zu übertragende Acylrest gleichzeitig als Schutzgruppe für die Thiolfunktion des Cysteins. Auch das zweite, lineare Transferprodukt ist zur Generierung einer zyklischen PNA befähigt. **204** entsteht über eine ringspannungsinduzierte (3+2)-Cycloaddition des transferierten Cyclooctins und der Azidgruppe aus **203**. Die Transfer-Zyklisierungsreaktion von **199** und **182** (Abbildung 72c) lieferte in Gegenwart von 0.1 Äquiv. des DNA-Templats Ras2 nach 3 h bzw. 7 h 11% bzw. 14% mehr Ausbeute als eine Transferreaktion ohne Zyklisierung der Produkte. Allerdings war die exakte Ausbeutebestimmung der Kontrollreaktion durch die Koelution der cyclooctintragenden Edukt- und Produktsonden von der HPLC-Säule schwierig (vgl. Kapitel 4.4.3). Daher dürfen diese Unterschiede nur als Richtwerte angesehen werden. In früheren



**Abbildung 72:** a) DNA-katalysierte Transfer-Zyklisierungsreaktion. b) Der chloracetylierte PNA-βAla-Cyclooctinthioester **199** hybridisiert neben der azidfunktionalisierten Cys-PNA **182** am DNA-Templat Ras2. c) HPLC-Spuren der Reaktion von **199** und **182**. d) Schmelzkurven der Komplexe aus linearem und zyklischem Transferprodukt und Ras.

Phasen der Umsetzung (1 h, ca. 50% Ausbeute) konnten interessanterweise noch keine Abweichungen in den Geschwindigkeiten der Reaktionen mit und ohne einen Zyklisierungsschritt festgestellt werden.

Die mit der komplementären DNA Ras3 durchgeführten Denaturierungsstudien belegten die starke Abnahme der Templataffinität der zyklischen PNA **185** im Vergleich zu ihrem linearen Pendant **205** (Abbildung 72d). Die Ursache für die erst bei deutlicher Produktinhibierung (> 50% Umsatz) einsetzende Effektivitätssteigerung liegt vermutlich in der erst nach der Dissoziation vom DNA-Templat stattfindenden Zyklisierung der Reaktionsprodukte. Die Dissoziationsraten der primär gebildeten, linearen PNA-Konjugate sind gegenüber denen aus herkömmlichen Transferreaktionen unverändert. Daher konnte die Zyklisierung erst dann zu einem gesteigerten *turnover* führen, wenn die Assoziation der Produkte die Reaktion am Templat entscheidend inhibiert.



## 5.2 Ausblick

Die im ersten Teil der Arbeit vorgestellte native chemische PNA-Verknüpfung während der enzymatischen Amplifizierung des DNA-Templats durch die PCR führte zu sehr niedrigen Nachweisgrenzen bei gleichzeitig hoher Einzelbasenspezifität. Allerdings war für die Erzeugung des Signals eine relativ große Anzahl an PCR-Zyklen notwendig. Um diese zu verringern, würden templatkontrollierte Reaktionen von Nutzen sein, die mit höherem *turnover* ablaufen als Verknüpfungsreaktionen. Fluorogene Acyltransferreaktionen<sup>[188]</sup> könnten neben der enzymatischen Vervielfältigung durch die PCR eine weitere Ebene der Amplifizierung einbringen. Da diese ebenfalls einem NCL-basierten Mechanismus folgen, wäre die Kompatibilität der involvierten funktionellen Gruppen mit den PCR-Bedingungen gegeben. Andererseits sind sequenzprogrammierte Verknüpfungsreaktionen, die während der PCR ablaufen, auch für Ansätze jenseits der Nukleinsäurediagnostik interessant. So könnte das Umschreiben von DNA-Bibliotheken in funktionalisierte PNA-Bibliotheken in SELEX-basierten Prozeduren schon während der Amplifizierung gelingen.<sup>[277,278]</sup> Damit wäre der Zugang zu PNA-basierten Aptameren möglich, deren Potential bisher nur wenig erforscht ist.

Eine weitere Verringerung der Templataffinitäten der im zweiten Teil der Arbeit behandelten Produkte aus Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen würde wahrscheinlich durch die Verwendung von kürzeren Zyklisierungslinkern ermöglicht.<sup>[250,251]</sup> Durch den Einsatz von DNA-basierten Reaktanden könnte außerdem die Zunahme der Templataffinität durch die Verknüpfung der Sonden zurückgedrängt werden.

Das vorgestellte Konzept der Transfer-Zyklisierung bietet schon jetzt einen Zugang zu Produkten mit niedrigerer Templataffinität als die der Reaktanden. Um den Effekt besser studieren zu können, wäre die Verwendung von fluorophormarkierten Sonden vorteilhaft. Würde beispielsweise ein FAM-markierter Thioester eingesetzt, gelänge die Quantifizierung der Reaktion mittels HPLC unabhängig von der Koelution zweier PNA-Konjugate. Der Einsatz von azidylierten Isocysteiny-PNAs könnte die Bildung der unerwünschten Verknüpfungsprodukte mit den bromacetylierten Thioestern zurückdrängen. Der Vorteil der schnellen Zyklisierung über die Thiol→Bromid-Substitution bliebe so erhalten. Außerdem könnte Thermozyklisierung die Dissoziationsraten der primär gebildeten, linearen Produkte erhöhen und damit den katalytischen Umsatz steigern. Die Generierung von Fluorophoren über den Zyklisierungsschritt ist ebenfalls vorstellbar. Azidgelöschte Cumarinfarbstoffe



eignen sich zum Beispiel für die Fluoreszenzaktivierung über ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloadditionen.<sup>[279,280]</sup> Es bleibt weiterhin zu klären, ob die für PNA-Transferreaktionen berichteten hohen Einzelbasenspezifitäten<sup>[188]</sup> auch mit den Transfer-Zyklisierungsreaktionen erreicht werden können.

Schließlich bieten Fragmentierungsreaktionen, die zur Spaltung eines längeren Oligonukleotids führen, eine weitere Option für die Synthese von Reaktionsprodukten mit niedriger Templataffinität. Diese entstünden dabei direkt am Nukleinsäuretemplat. Eine isotherme Reaktionsführung unterhalb der Schmelztemperatur der längeren Eduktsonden aber oberhalb jener der beiden kurzen Produktfragmente sollte hier zu hohem *turnover* führen.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Boc/Cbz-geschützte PNA-Monomere wurden von *Applied Biosystems* oder *ASM Research Chemicals* und Fmoc/Bhoc-geschützte PNA-Monomere von *Link Technologies* oder *Panagene* erworben. Boc-geschützte Aminosäuren wurden von *NeoMPS* und Fmoc-geschützte Aminosäuren sowie MBHA-Harz von *Novabiochem* oder *Biosolve* bezogen. Die geschützten Aminosäurebausteine Boc-Cys<sup>Fm</sup>-OH, Cbz-Gly-OH und Cbz-βAla-OH stammten von *Iris Biotech*, *TCI* und *Acros*. Es kam Tentagel<sup>®</sup> Rink Amid-Harz der Firma *Rapp Polymere* und Kupplungsreagenzien (HBTU, HCTU, HOBt, PyBOP) von *Iris Biotech* oder *Chemcube* zum Einsatz. Die Fluorophore 6-Carboxyfluorescein und 6-Carboxytetramethylrhodamin stammten von *ChemPep*. Die modifizierten PNA-Cytosin- und PNA-Thyminmonomere **102** und **103** wurden ebenso wie Thymin-1-yl-essigsäure und *N*<sup>4</sup>-Cbz-Cytosin-1-yl-essigsäure bereits während der Diplomarbeit synthetisiert.<sup>[243]</sup> Boc-*i*Cys<sup>Trt</sup>-OH<sup>[65,281]</sup> wurde von Dr. Anne Adams, Fmoc-*i*Cys<sup>Trt</sup>-OH<sup>[281]</sup> von Dr. Christian Dose, das Cyclooctin **180**<sup>[282,283]</sup> (ALO-OH) von Dr. Gerbrand van der Heden van Noort und *S*-Trt-4-Mercaptophenylessigsäure<sup>[254]</sup> von Ulrike Reinhardt nach literaturbekannten Methoden synthetisiert. Synthetische DNA-Template und Primer wurden von *BioTeZ* in HPLC-Qualität erworben. In der PCR kamen aus menschlichem Blut (Leukozytenfilm, *buffy coat*) isolierte Wildtyp-DNA von *Roche* bzw. aus der menschlichen Melanomzelllinie SK-MEL28 isolierte, einzelbasenmutierte DNA von *LGC standards* (in Kooperation mit der *American Type Culture Collection*, *ATCC*, Produktbezeichnung: HTB-72D) zum Einsatz. Die PCR-Reagenzien Magnesiumchlorid, dNTP-Mix *long range*, Reaktionspuffer *high specificity S* (Konzentrat: 10×), *enhancer solution P* (Konzentrat: 5×) und die *peqGOLD Taq*-DNA-Polymerase wurden wie der Ladepuffer (Konzentrat: 6×) für die Gelelektrophorese von *peqLab* bezogen. Die Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung zum Herstellen der Gele stammte von *Roth*. Die Oligonukleotid-leiter (*Gene Ruler™ Ultra Low Range DNA-Ladder, Ready-to-Use*) wurde von *Fermentas* und der Interkalatorfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Gold (Konzentrat: 10000×) von *Invitrogen* erworben. *N,N*-Dimethylformamid (DMF, *peptide synthesis grade*) zur Festphasensynthese und Acetonitril (*super gradient*) für die HPLC stammten von VWR. Alle anderen Chemikalien wurden von *Acros*, *AlfaAesar*, *Fluka* oder *Sigma-Aldrich* erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wasserfreie Lösungsmittel wurden durch dynamische Trocknung in einer Anlage des Typs *MB SPS-800* der Firma *M. Braun* erhalten. Die zur Säulenchromato-

grafie eingesetzten Lösungsmittel Cyclohexan und Essigsäureethylester wurden vor Gebrauch frisch destilliert. Entgastes und anschließend mit Argon gesättigtes Dichlormethan (DCM) wurde durch einstündiges Einleiten von Argon in wasserfreies DCM erhalten. Für das Herstellen von wässrigen Lösungen diente durch Aufbereitung in der Reinstwasseranlage *Astacus LifeScience* der Firma *MembraPure* erhaltenes Wasser der Reinheitsstufe Typ 1. Entgaste und anschließend mit Argon gesättigte Puffer wurden durch Auftauen der gefrorenen Puffer bei 140 mbar und anschließende Belüftung mit Argon erhalten.

## 6.2 Geräte und Hilfsmittel

**Dünnschichtchromatografie (DC):** Dünnschichtchromatogramme wurden auf mit Silicagel beschichteten Dünnschichtchromatografieplatten (Porenweite: 60 Å) der Firma *Merck* angefertigt. Die Detektion der Substanzen erfolgte entweder mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, oder durch Anfärben mit Ninhydrinlösung (300 mg Ninhydrin auf 100 mL *n*-Butanol und 3 mL Essigsäure) bzw. mit dem Seebach-Reagenz (1 g Cer(IV)sulfat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure auf 92 mL Wasser und 8 mL konzentrierte Schwefelsäure).

**Säulenchromatografie:** Für die Säulenchromatografie wurde Kieselgel (Porenweite: 60 Å, Korngröße: 35–70 µm) der Firma *Acros* verwendet.

**Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie):** Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem *AVANCE II 300, 400 oder 500* Gerät von *Bruker* gemessen. Als Lösungsmittel dienten  $\text{CDCl}_3$  oder  $\text{DMSO-d}_6$  der Firma *deutero*. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben. Alle Spektren wurden an Hand der charakteristischen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale der jeweiligen Lösungsmittel kalibriert:  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$ : Singulett, 7.26 ppm,  $^{13}\text{C}$ : Triplett, 77.0 ppm),  $\text{DMSO-d}_6$  ( $^1\text{H}$ : Quintett, 2.50 ppm,  $^{13}\text{C}$ : Septett, 39.43 ppm). Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, td = Triplett vom Duplett und m = Multipllett.

**Massenspektrometrie (MS):** Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mit dem Gerät *Finnigan LTQ-FT* der Firma *ThermoElectron* aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte über Elektrosprayionisation (ESI). Nicht hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer der Serie *1100* der Firma *Agilent* aufgenommen. MALDI/TOF-Massenspektren wurden an einer *Voyager-DE™ Pro Biospectrometry Workstation* von

*PerSeptive Biosystems* oder einem *AXIMA Confidence* Gerät von *Shimadzu* im positiven Modus aufgenommen. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in Wasser/Acetonitril/TFA, 700:300:1, v:v:v). Die Messwerte sind in Verhältnissen von Masse zu Ladung ( $m\cdot z^{-1}$ ) angegeben.

**(Semi-)präparative Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC):** Zur (semi-)präparativen HPLC-Trennung wurde eine Anlage der Serie *1100* von *Agilent* verwendet. Die Detektion erfolgte durch einen UV-Detektor bei der Wellenlänge  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Zur präparativen Trennungen diente eine Säule des Typs *Nucleodur<sup>®</sup> C18 Gravity* ( $5 \mu$ ,  $250\times 21 \text{ mm}$ , Porenweite:  $110 \text{ \AA}$ ) der Firma *Machery&Nagel*. Für die semi-präparative Trennungen wurde eine Säule des Typs *Polaris C18 A* ( $5 \mu$ ,  $250\times 10 \text{ mm}$ , Porenweite:  $220 \text{ \AA}$ ) der Firma *Varian* genutzt. Als mobile Phase dienten binäre Gemische aus A1 (Wasser/Acetonitril/TFA, 989:10:1, v:v:v) und B1 (Acetonitril/Wasser/TFA, 989:10:1, v:v:v). Es wurden folgende Gradienten gebraucht:

**Gradient 1:** 0% B1 für 10 min, dann von 0% B1 auf 40% B1 in 30 min

(Flussrate:  $12.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , präparative Trennung)

**Gradient 2:** von 3% B1 auf 40% B1 in 30 min

(Flussrate:  $6.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , semi-präparative Trennung)

**Analytische HPLC:** Zur analytischen HPLC-Trennung wurde eine Anlage der Serie *Elite LaChrom* von *Merck Hitachi* verwendet. Die Detektion erfolgte durch einen Dioden-Array-Detektor bei der Wellenlänge  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Für die Trennungen wurde eine auf  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$  temperierte Säule des Typs *Polaris C18 A* ( $5 \mu$ ,  $250\times 4.6 \text{ mm}$ , Porenweite:  $220 \text{ \AA}$ ) der Firma *Varian* genutzt. Als mobile Phase dienten binäre Gemische aus A1 (Wasser/Acetonitril/TFA, 989:10:1, v:v:v) und B1 (Acetonitril/Wasser/TFA, 989:10:1, v:v:v). Es wurden folgende Gradienten gebraucht:

**Gradient 3:** von 3% B1 auf 40% B1 in 20 min (Flussrate:  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

**Gradient 4:** von 3% B1 auf 30% B1 in 30 min (Flussrate:  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

**Gradient 5:** von 3% B1 auf 30% B1 in 30 min (Flussrate:  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

**Gradient 6:** von 3% B1 auf 30% B1 in 20 min (Flussrate:  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

**Gradient 7:** von 3% B1 auf 35% B1 in 30 min (Flussrate:  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )

**Analytische HPLC/MS:** Für die analytische HPLC/MS wurde eine mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer ausgestattete Anlage der Serie *1100* von *Agilent* verwendet. Die

Detektion erfolgte durch einen UV-Detektor bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm. Für die Trennungen wurden auf 55 °C temperierte Säulen des Typs *Polaris C18 A* (3  $\mu$ , 100×2 mm, Porenweite: 130 Å bzw. 5  $\mu$ , 250×4.6 mm, Porenweite: 220 Å) der Firma *Varian* genutzt. Als mobile Phase dienten binäre Gemische aus A2 (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 989:10:1, v:v:v) und B2 (Acetonitril/Wasser/ Ameisensäure, 989:10:1, v:v:v). Es wurden folgende Gradienten gebraucht:

**Gradient 8:** von 3% B2 auf 20% B2 in 20 min (Flussrate: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>)

**Gradient 9:** von 3% B2 auf 30% B2 in 20 min (Flussrate: 0.3 mL·min<sup>-1</sup>)

**UPLC®:** Zur UPLC®-Trennung wurde ein *Acquity UPLC®* System von *Waters* verwendet. Die Detektion erfolgte durch einen UV-Detektor bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm. Für die Trennungen wurden auf 50 °C temperierte Säulen des Typs *X-Bridge C18 BEH/CSH 130* (1.7  $\mu$ , 50×2.1 mm, Porenweite: 130 Å) der Firma *Waters* genutzt. Als mobile Phase dienten binäre Gemische aus A1 (Wasser/Acetonitril/TFA, 989:10:1, v:v:v) und B1 (Acetonitril/Wasser/TFA, 989:10:1, v:v:v). Es wurden folgende Gradienten gebraucht:

**Gradient 10:** von 3% B1 auf 15% B1 in 2 min (Flussrate: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>)

**Gradient 11:** von 3% B1 auf 15% B1 in 8 min (Flussrate: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>)

**Gradient 12:** von 3% B1 auf 20% B1 in 2 min (Flussrate: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>)

**Gradient 13:** von 3% B1 auf 30% B1 in 2 min (Flussrate: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>)

**Gradient 14:** von 3% B1 auf 40% B1 in 2 min (Flussrate: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>)

**UV/Vis-Spektroskopie:** Zur Bestimmung des Beladungsgrads von mit Fmoc- oder Fm-geschützten Aminosäuren beladenen MBHA-Harzen wurde das Gerät *NanoDrop™ 1000* der Firma *peqLab* genutzt. Die Konzentrationsbestimmung von DNA und PNA Stammlösungen sowie die Denaturierungsexperimente erfolgten an dem Gerät *Carey 100 Bio* der Firma *Varian* in UV-Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm.

*UV-spektrometrische Bestimmung des Beladungsgrads von mit Fmoc- oder Fm-geschützten Aminosäuren beladenen MBHA-Harzen:* Eine kleine Menge des beladenen Harzes (ca. 2–4 mg) wurde eingewogen und 10 min in 1 mL Piperidin/DMF (1:4, v:v) geschüttelt. Ein Spektrum von 2  $\mu$ L reiner Piperidin/DMF-Lösung wurde als Basislinie definiert und die Extinktionen  $E$  von 2  $\mu$ L Abspaltlösung bei  $\lambda = 300$  nm bestimmt. Die Konzentrationen des Piperidin-Fulvenaddukts wurde über das Lambert-Beersche Gesetz ( $E = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ ) unter Berück-

sichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{300} = 7800 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  als Mittelwert aus mindestens drei Messungen berechnet.

*UV-spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- und PNA-Stammlösungen:* Aliquote der Stammlösungen wurden auf 100  $\mu\text{L}$  mit Puffer (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.0 (DNAs, TMR-markierte und nicht fluorophormarkierte PNA-Konjugate) bzw. 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 9.0 (FAM-markierte PNA-Konjugate)) verdünnt. Ein Spektrum von 100  $\mu\text{L}$  reinem Puffer wurde als Basislinie definiert und die Extinktionen  $E$  der verdünnten Stammlösungen bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  (DNAs, nicht fluorophormarkierte PNA-Konjugate),  $\lambda = 565 \text{ nm}$  (TMR-markierte PNA-Konjugate) oder  $\lambda = 492 \text{ nm}$  (FAM-markierte PNA-Konjugate) bestimmt. Die Konzentrationen wurden über das Lambert-Beersche Gesetz ( $E = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ ) unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{260}$  (DNAs: vom Hersteller *BioTeZ* angegeben, nicht fluorophormarkierte PNA-Konjugate: über das *nearest neighbor* Modell auf <http://biophysics.idtdna.com/UVSpectrum.html> (Stand: 27.02.2014) berechnet<sup>[284]</sup>),  $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (TMR) oder  $\varepsilon_{492} = 78000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (FAM) als Mittelwert aus mindestens drei Messungen berechnet.

*Denaturierungsexperimente:* Die angegebenen Mengen der PNA-Konjugate und DNA-Template wurden auf 1 mL in Quarzküvetten mit dem jeweils beschriebenen Puffer verdünnt und im UV/Vis-Spektrometer platziert. Die Lösungen wurden auf 95 °C erhitzt (10 °C·min<sup>-1</sup>), 5 min equilibriert, auf die jeweilige Starttemperatur (15–20 °C) abgekühlt (1 °C·min<sup>-1</sup>) und nochmals 5 min equilibriert. Die Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  wurde 3× in Abhängigkeit von der Temperatur während des Erhitzens auf 95 °C (0.5 °C·min<sup>-1</sup>) mit einem Datenintervall von 0.1 °C aufgenommen. Die ersten Ableitungen der Schmelzkurven wurden, wenn möglich, mit dem zum Gerät gehörenden Programm berechnet oder mit Hilfe des Programms *OriginPro 8G* der Firma *OriginLab* über eine sigmoidale Ausgleichsfunktion bestimmt. Die Schmelztemperaturen entsprechen den Maxima der ersten Ableitungen und wurden als Mittelwerte von mindestens zwei Kurven berechnet. Relative Absorptionen wurden durch Division des ersten gemessenen Werts erhalten und gegebenenfalls auf Werte zwischen 0 und 1 normalisiert.

**Fluoreszenzspektroskopie:** Es wurde das Gerät *Carey Eclipse* der Firma *Varian* verwendet. Alle Messungen wurden, falls nicht anders angegeben, in 1 mL Fluoreszenz-Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$  durchgeführt und die Lösungen mit Anregungslicht der Wellenlänge 470 nm bestrahlt. Für Kinetikmessungen wurden die Fluoreszenzintensitäten bei

523 nm (FAM) und 585 nm (TMR) zeitabhängig aufgenommen. Jeder Datenpunkt wurde über eine Messzeit von 1.5 s gemittelt. Die Fluoreszenzspektren wurden über einen Bereich von 470–700 nm mit einer Messrate von  $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  aufgenommen. Die Anregungs- und Emissionsfilterschlitzbreiten waren jeweils auf  $\pm 5 \text{ nm}$  und die Spannung des *photo multiplier*-Detektors auf *medium* eingestellt.

**Polymerasekettenreaktion (PCR):** Der Mastermix wurde in 1.7 mL *SafeSeal microcentrifuge tubes (low binding polymer technology)* der Firma *Sorenson BioScience* vorbereitet. Die PCRs wurden am *iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time Detection System* der Firma *BioRad* in 0.2 mL *semi-skirted 96 well plates* der Firma *peqLab* durchgeführt. Die Detektion der FAM- bzw. der SYBR<sup>®</sup> Gold-Fluoreszenz während der PCR erfolgte mit einem Anregungsfilter der Wellenlänge  $490 \pm 20 \text{ nm}$  und einem Emissionsfilter der Wellenlänge  $530 \pm 30 \text{ nm}$ . Die Detektion der FRET-induzierten TMR-Fluoreszenz erfolgte mit einem Anregungsfilter der Wellenlänge  $485 \pm 30 \text{ nm}$  und einem Emissionsfilter der Wellenlänge  $585 \pm 20 \text{ nm}$ . Die Länge des Vorwärtsprimers **2** (VP2) wurde mit Hilfe des Programms *Primer3*<sup>[285]</sup> (Standardeinstellungen) auf <http://primer3.ut.ee/> (Stand: 27.02.2014) an die von RP1 angepasst, sodass annähernd gleiche Schmelztemperaturen berechnet wurden.

**Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE):** Die PAGE-Experimente wurden mit einem Spannungsgenerator des Typs *PS 9009 TX* der Firma *Apelex* durchgeführt. Es wurden folgende Pufferstammlösungen verwendet: 0.5 M EDTA-Puffer (73 g EDTA auf 500 mL mit Wasser aufgefüllt und mit 2 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt), TBE-Puffer (Konzentrat: 10 $\times$ , 108 g TRIS·HCl, 55 g Borsäure und 40 mL 0.5 M EDTA-Puffer auf 1 L mit Wasser aufgefüllt), 0.5 $\times$  TBE-Puffer (50 mL TBE-Puffer (Konzentrat: 10 $\times$ ) auf 1 L mit Wasser aufgefüllt), 20% Acrylamidpuffer (100 mL *Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40* (19:1, Acrylamid: Bisacrylamid) und 10 mL TBE-Puffer (Konzentrat: 10 $\times$ ) auf 200 mL mit Wasser aufgefüllt). Die mit SYBR<sup>®</sup> Gold behandelten Gele wurden an einem Bildgebungsgerät des Typs *4000 MM PRO* der Firma *Kodak* bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm analysiert.

**Gefriertrocknung:** Zum Entfernen von Lösungsmitteln durch Gefriertrocknung kam das Gerät *Alpha 2–4* der Firma *Christ* zum Einsatz.

**Thermoschüttler:** Es wurden Thermoschüttler des Typs *MKR 10* der Firma *HLC* verwendet.

**Festphasensynthese:** Die Beladung von MBHA-Harz erfolgte in 10 mL Spritzenreaktoren der Firma *MultiSynTech*. Die PNA-Konjugate wurden in 2 mL Spritzenreaktoren der Firma *Braun* synthetisiert. Die automatisierte Festphasensynthese erfolgte an einem Parallelsyntheseautomaten des Typs *ResPep* der Firma *Intavis* in *microscale column* (1–5  $\mu\text{mol}$ )-Reaktoren.

### 6.3 Allgemeine Syntheseprotokolle

**Erstbeladung von MBHA-Harz mit Fmoc- bzw. Fm-geschützten Aminosäuren:** 250 mg MBHA-Harz HL (100–200 *mesh*, Beladungsgrad:  $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 300  $\mu\text{mol}$ ) wurden zum Quellen 1 h in 2 mL DMF geschüttelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5 $\times$  DMF, 5 $\times$  DMF/DIPEA (19:1, *v:v*, davon 2 $\times$  10 min), 10 $\times$  DMF, je 2 mL) und über Nacht in einer Lösung aus 100  $\mu\text{mol}$  der entsprechenden Aminosäure (29.7 mg Fmoc-Gly-OH, 58.6 mg Fmoc-Cys<sup>Trt</sup>-OH oder 40.0 mg Boc-Cys<sup>Fm</sup>-OH), 100  $\mu\text{mol}$  PyBOP (52.0 mg) und 300  $\mu\text{mol}$  NMM (33.0  $\mu\text{L}$ ) in 2 mL DMF geschüttelt. Es wurde erneut gewaschen (15 $\times$  DMF, je 2 mL), 2 $\times$  5 min in DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, *v:v:v*, je 2 mL) geschüttelt, gewaschen (5 $\times$  DMF, 10 $\times$  DCM, je 2 mL) und Lösungsmittelreste unter vermindertem Druck entfernt. Der Beladungsgrad wurde über die Abspaltung der Fmoc- bzw. der Fm-Schutzgruppe UV-spektrometrisch bestimmt (Kapitel 6.2) und betrug 0.1–0.3  $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ .

**Herstellung von mit S-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz:** Die Synthese erfolgte an 50  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz 4 $\times$  5 min in einer Mischung aus Piperidin/DMF (1:4, *v:v*, je 2 mL) geschüttelt und gewaschen (15 $\times$  DMF, je 2 mL). Anschließend wurde das Harz in einer Lösung aus 10 Äquiv. S-Trt-Mercaptopropionsäure (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.2 M), 10 Äquiv. PyBOP und 12 Äquiv. NMM in DMF 2 $\times$  30 min geschüttelt und gewaschen (5 $\times$  DMF, je 2 mL). Zur Blockierung von nicht umgesetzten Aminofunktionen wurde das Harz 2 $\times$  5 min in 2 mL DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, *v:v:v*) geschüttelt, gewaschen (5 $\times$  DMF, 10 $\times$  DCM, je 2 mL) und Lösungsmittelreste unter vermindertem Druck entfernt.

**Manuelle Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie:** Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge beladenes MBHA-Harz in einen Reaktor eingewogen, zum Quellen 30 min in 1 mL DMF geschüttelt und gewaschen (5 $\times$  DMF, je 1 mL). Als PNA-Monomere wurden Boc-a<sup>Cbz</sup>-OH, Boc-c<sup>Cbz</sup>-OH, Boc-g<sup>Cbz</sup>-OH und Boc-t-OH verwendet.



*Initiale Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe:* Das Harz wurde 4× 5 min in Piperidin/DMF (1:4, v:v, je 1 mL) geschüttelt und gewaschen (15× DMF, je 1 mL).

*Abspaltung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe:* Das Harz wurde 5 min in 1 mL TFA/*m*-Kresol (19:1, v:v) geschüttelt und gewaschen (10× DCM, 5× DMF, je 1 mL).

*Kupplung der Monomere:* Das Harz wurde in einer Lösung aus 4 Äquiv. des geschützten Monomers (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 8 Äquiv. NMM in DMF 30 min geschüttelt und gewaschen (5× DMF, je 1 mL). Wenn bei einer Synthese Abbruchsequenzen auftraten, wurde im nächsten Ansatz die Kupplung der entsprechenden PNA-Monomere bis zu 2× wiederholt.

*Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen:* Das Harz wurde 3 min in 1 mL DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, v:v:v) geschüttelt und gewaschen (5× DMF, 10× DCM, je 1 mL).

*Freisetzung vom Harz:* Das Harz wurde gewaschen (5× DMF, 10× DCM, je 1 mL). Methode A: Das Harz wurde 3 h in 700 µL TFA/TFMSA/*m*-Kresol (16:3:1, v:v:v) geschüttelt. Anschließend wurde 3× mit je 300 µL TFA extrahiert. Methode B: Das Harz wurde 3× 5 min in 1 mL TFA/TIS/*m*-Kresol (18:1:1, v:v:v) geschüttelt. Anschließend wurde wie bei Methode A verfahren.

*Reinigung:* Die vereinigten Abspalt- und Extraktionslösungen wurden unter vermindertem Druck auf ca. 100 µL eingengt. Die Fällung der Rohprodukte erfolgte durch die Zugabe von 1.5 mL kaltem Diethylether. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der Rückstand erneut in 1.5 mL kaltem Diethylether suspendiert (Ultraschallbad). Nach der Zentrifugation wurde der erhaltene Feststoff im Argonstrom getrocknet und in Wasser oder in Wasser/Acetonitril/TFA (max. 50 vol% Acetonitril und 1 vol% TFA) aufgenommen. Nach der Reinigung mittels semi-präparativer HPLC wurden die über MALDI/TOF-MS oder ESI-MS identifizierten Produktfraktionen vereint, in flüssigem Stickstoff gefroren und durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in entgastem Wasser aufgenommen und die Konzentration UV/Vis-spektroskopisch bestimmt (Kapitel 6.2).

**Automatisierte Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie:** Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge beladenes MBHA-Harz oder unbeladenes Tentagel® Rink Amid-Harz (Linker: 0.180 mmol·g<sup>-1</sup>) in einen *microscale column*-Reaktor

eingewogen, zum Quellen 30 min in 150  $\mu\text{L}$  DMF suspendiert und im Synthesautomaten platziert. Als PNA-Monomere wurden Fmoc-a<sup>Bhoc</sup>-OH, Fmoc-c<sup>Bhoc</sup>-OH, Fmoc-g<sup>Bhoc</sup>-OH und Fmoc-t-OH verwendet.

*Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe:* Das Harz wurde 2 $\times$  2 min mit Piperidin/DMF (1:4, v:v, je 250  $\mu\text{L}$ ) behandelt und gewaschen (5 $\times$  DMF, je 300  $\mu\text{L}$ ).

*Kupplung der Monomere:* Das Harz wurde 2 $\times$  30 min mit einer Lösung aus 4 Äquiv. des Monomers (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.14 M), 3.6 Äquiv. HBTU oder HCTU (für Aminosäuren wurden 3.6 Äquiv. HOBt zugesetzt) und 12 Äquiv. NMM in NMP versetzt und gewaschen (5 $\times$  DMF, je 300  $\mu\text{L}$ ).

*Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen:* Das Harz wurde 3 min mit 250  $\mu\text{L}$  DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, v:v:v) behandelt und gewaschen (5 $\times$  DMF, je 300  $\mu\text{L}$ ).

*Freisetzung vom Harz:* Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor überführt. MBHA-Harz: Die Freisetzung vom Harz erfolgte analog zu Methode B für die manuelle Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie. TentaGel<sup>®</sup> Rink Amid-Harz: Das Harz wurde gewaschen (5 $\times$  DMF, 10 $\times$  DCM, je 1 mL) und 1.5 h in 700  $\mu\text{L}$  TFA/TIS/Wasser (18:1:1, v:v:v) geschüttelt. Anschließend wurde 3 $\times$  mit je 300  $\mu\text{L}$  TFA extrahiert.

*Reinigung:* Die Reinigung erfolgte wie für die durch manuelle Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie hergestellten PNA-Konjugate beschrieben.

**Kupplung von Boc-Cys<sup>Trt</sup>-OH und Boc-iCys<sup>Trt</sup>-OH<sup>[65,281]</sup>:** Nach dem Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe des zuletzt gekuppelten Monomers wurde das Harz 3 $\times$  30 min und 1 $\times$  über Nacht in einer Lösung aus 4 Äquiv. des geschützten (Iso)cysteinderivats (bezüglich der Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 12 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt und gewaschen (5 $\times$  DMF, je 1 mL).

**Kupplung von FAM-OH und TMR-OH:** Die Umsetzung erfolgte nach dem Aufbau der Sequenzen am polymeren Träger. FAM-OH: Zum Abspalten der Alloc-Schutzgruppe an den modifizierten PNA-Monomeren **102**<sup>[243]</sup> oder **103**<sup>[243]</sup> wurde das Harz (5  $\mu\text{mol}$ , bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) zunächst gewaschen (5 $\times$  entgastes und anschließend mit Argon gesättigtes DCM, je 1 mL). Nach der Zugabe der Allylfängerlösung (10 Äquiv. *N,N'*-Dimethylbarbitursäure (DMB) in 250  $\mu\text{L}$  entgastem und anschließend mit

Argon gesättigtem DCM) wurde auch die Abspalllösung (1 Äquiv.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in 300  $\mu\text{L}$  entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem DCM) unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre zum Harz gegeben und 30 min geschüttelt. Nach dem Waschen ( $5\times$  DCM,  $5\times$  DMF,  $5\times$  entgastes und anschließend mit Argon gesättigtes DCM, je 1 mL), wurde der Vorgang wiederholt und nochmals gewaschen ( $5\times$  DCM,  $5\times$  DMF,  $2\times$  Dioxan/Wasser (9:1, v:v),  $2\times$  Methanol,  $15\times$  DMF, je 1 mL). Das Harz wurde anschließend  $2\times$  1 h in einer Lösung aus 4 Äquiv. 6-Carboxyfluorescein (FAM-OH, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 10 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt und gewaschen ( $10\times$  DMF,  $10\times$  DCM, je 1 mL). TMR-OH: Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe an den modifizierten PNA-Monomeren **110** oder **111** wurde das Harz gewaschen ( $5\times$  DMF, je 1 mL) und  $4\times$  5 min in Piperidin/DMF (1:4, v:v, je 1 mL) geschüttelt. Nach dem Waschen ( $15\times$  DMF, je 1 mL) wurde das Harz  $2\times$  1 h in einer Lösung aus 4 Äquiv. 6-Carboxytetramethylrhodamin (TMR-OH, bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 10 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt und gewaschen ( $10\times$  DMF,  $10\times$  DCM, je 1 mL).

**Acetylierung des N-Terminus:** Nach dem Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe des zuletzt gekuppelten Monomers wurde das Harz  $2\times$  5 min in 1 mL DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, v:v:v) geschüttelt und gewaschen ( $10\times$  DMF,  $10\times$  DCM, je 1 mL).

**Halogenacetylierung des N-Terminus:** Nach dem Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe des zuletzt gekuppelten Monomers wurde das Harz  $2\times$  30 min in einer Lösung aus 10 Äquiv. Halogenessigsäure (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 10 Äquiv. PyBOP und 12 Äquiv. NMM geschüttelt und gewaschen ( $10\times$  DMF,  $10\times$  DCM, je 1 mL).

**Synthese von Verknüpfungsprodukten:** Alle Arbeiten wurden unter einem Strom von Argon durchgeführt. Aliquote (5–30 nmol) der entsprechenden reaktiven PNA-Konjugate wurden gefriergetrocknet und separat in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM MESNa, 30 vol% DMF, 20 vol% Acetonitril, pH 7.4, Endkonzentration der Reaktanden: 200  $\mu\text{M}$ ) gelöst bzw. suspendiert. Nach 1 h wurden beide Lösungen vereint und 19 h–3 d bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 10 vol% TFA wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem TCEP-Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM TCEP, pH 7.4) aufgenommen und 1 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung mit

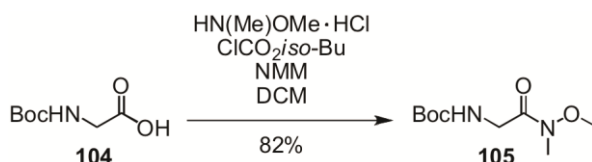
1 vol% TFA versetzt und mittels analytischer HPLC gereinigt (Gradient 3). Die Ausbeuten wurden UV/Vis-spektroskopisch über die Absorption des FAM-Fluorophors bestimmt (Kapitel 6.2).

**Synthese von PNA-MESNA-Thioestern durch Umthioesterung:** Alle Arbeiten wurden unter einem Strom von Argon durchgeführt. Die jeweiligen PNA-Mercaptopropionsäurethioester wurden in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM MESNa, 20 vol% Acetonitril, pH 7.4) aufgenommen, bis sie vollständig gelöst waren. Nach 1 h (PNA-Glycylthioester) oder 3 h (PNA- $\beta$ Alanylthioester) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 vol% TFA beendet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand nach Aufnahme in Wasser oder gegebenenfalls in Wasser/Acetonitril/TFA (max. 50 vol% Acetonitril und 1 vol% TFA) mittels semi-präparativer HPLC gereinigt.

## 6.4 Versuche zur PNA-Verknüpfung während der PCR

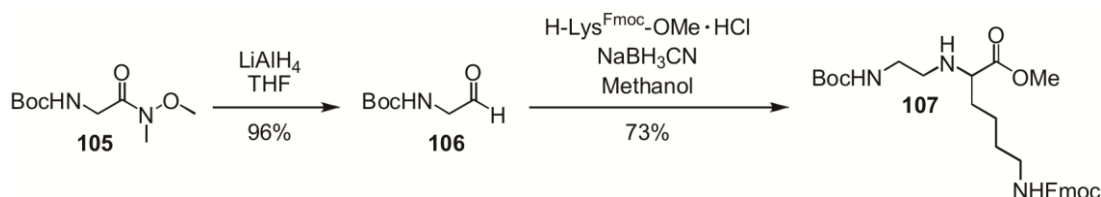
### 6.4.1 Synthese der modifizierten PNA-Monomere

#### „Weinrebamid“ des *N*-Boc-Glycins (**105**)



Die Synthese des „Weinrebamids“ **105** erfolgte nach einer literaturbekannten Methode.<sup>[286]</sup> Bei der Charakterisierung des Produkts wurde Übereinstimmung mit den Literaturdaten festgestellt.

#### Modifiziertes PNA-Rückgrat (**107**)



Die Synthese des N-Boc-Glycinaldehyds **106** erfolgte nach einer literaturbekannten Methode<sup>[286]</sup> mit einigen Modifikationen: In 125 mL wasserfreiem THF wurden unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre 500 mg **105** (2.29 mmol) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 818 µL Lithiumaluminiumhydridsuspension in THF/Toluol (3.5 M, 2.86 mmol) getropft und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 mL wässriger Kaliumhydrogensulfatlösung (0.2 M) beendet und filtriert. Der Feststoff wurde mit wenig THF gewaschen und das Filtrat mit 50 mL Diethylether versetzt. Die organische Phase wurde 4× mit je 50 mL wässriger Kaliumhydrogensulfatlösung (0.2 M) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden 5× mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 3× mit je 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **106** als ein leicht gelbliches Öl erhalten (350 mg, 2.20 mmol, 96%, DC:  $R_f$  = 0.34 (Cyclohexan/Essigsäure-ethylester 3:2, v:v)). Dieses wurde zusammen mit 2.77 g *N*<sup>ε</sup>-Fmoc-Lysinmethylesterhydrochlorid (6.60 mmol) unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre in 50 mL wasserfreiem Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 166 mg Natriumcyanoborhydrid (2.64 mmol) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, an Kieselgel adsorbiert und anschließend säulenchromatografisch gereinigt (DCM/Methanol 9:1, v:v). Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **107** als ein farbloses Öl erhalten (839 mg, 1.60 mmol, 73%).

Ausbeute: 70% über 2 Stufen.

$C_{29}H_{39}N_3O_6$  (525.64 g·mol<sup>-1</sup>).

DC:  $R_f$  = 0.80 (DCM/Methanol 9:1, v:v).

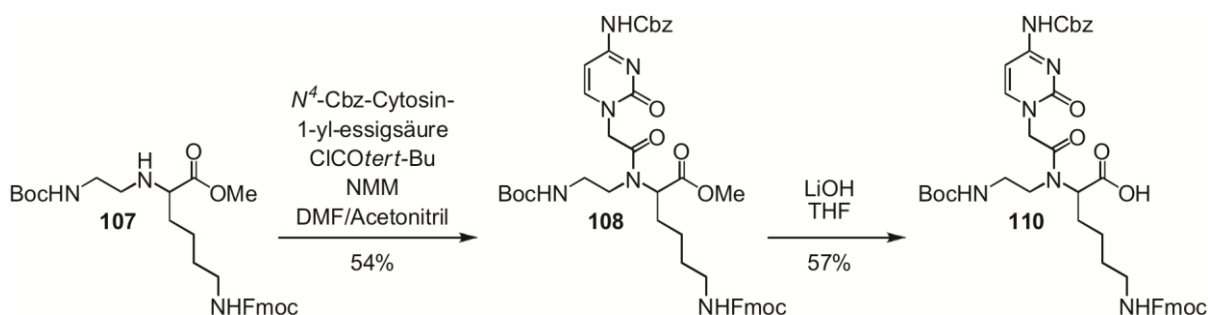
ESI-HR-FTMS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$ : 526.2926 (ber.: 526.2912).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.21–1.72 (m, 15H, 3× CH<sub>3</sub>(Boc), 3× CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 2.09 (s, 1H, NH(Rückgrat)), 2.49–2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 2.70–2.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 3.08–3.26 (m, 5H, 2× CH<sub>2</sub>(Seitenkette), CH(Rückgrat)), 3.70 (s, 3H, O–CH<sub>3</sub>), 4.20 (t,  $J$  = 6.7, 1H, CH(Fmoc)), 4.39 (d,  $J$  = 6.8, 2H, O–CH<sub>2</sub>(Fmoc)), 4.87 und 4.98 (2× s, 2H, 2× NH(Boc und Fmoc)), 7.30 (td,  $J$  = 7.4, 1.2, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.39 (t,  $J$  = 7.2, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.59 (d,  $J$  = 7.4, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.75 (d,  $J$  = 7.4, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)).

<sup>13</sup>C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 22.8 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 28.3 (3× CH<sub>3</sub>(Boc)), 29.5 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 32.8 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 40.2 (CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 40.7 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)),

47.2 (CH(Fmoc)), 47.4 (CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 51.7 (O–CH<sub>3</sub>), 60.8 (CH(Rückgrat)), 66.4 (O–CH<sub>2</sub>(Fmoc)), 79.1 (C<sub>quat.</sub>(Boc)), 119.9 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 124.9 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 126.9 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 127.6 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 141.2 (2× C<sub>quat.</sub>(Fmoc)), 143.9 (2× C<sub>quat.</sub>(Fmoc)), 156.0 (CO(Boc)), 156.4 (CO(Fmoc)), 175.6 (COOMe).

### Modifiziertes PNA-Cytosinmonomer (110)



In 15 mL wasserfreiem DMF/Acetonitril (1:1, v:v) wurden unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre 468 mg *N*<sup>4</sup>-Cbz-Cytosin-1-yl-essigsäure<sup>[243]</sup> (1.54 mmol) gelöst und auf –15 °C (Eis/Methanol) gekühlt. Anschließend wurden 755 µL NMM (6.86 mmol) und nach weiteren 5 min 241 µL Pivaloylchlorid (1.95 mmol) zugegeben. Nach 20 min wurde die Suspension mit einer Lösung aus 601 mg **107** (1.14 mmol) in 10 mL wasserfreiem DMF versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Essigsäureethylester wurde die Lösung 3× mit je 50 mL 0.1 M HCl gewaschen und die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingedunstet, der Rückstand an Kieselgel adsorbiert und anschließend säulenchromatografisch gereinigt (Essigsäureethylester). Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **108** als ein amorpher, weißer Schaum erhalten (501 mg, 0.62 mmol, 54%, DC: *R<sub>f</sub>* = 0.38 (Essigsäureethylester)). Dieser wurde in 6 mL THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend tropfenweise mit einem Äquivalent wässriger Lithiumhydroxidlösung (0.2 M) versetzt. Nach 1 h wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mittels DC der Reaktionsumsatz bestimmt. Da noch Edukt vorhanden war, wurden schrittweise weitere 0.2 Äquiv. der Base bis zu einem Maximalwert von 2.0 Äquiv. zugegeben. Nach 5 h wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert und mit 20 mL Wasser versetzt. Die Lösung wurde 6× mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatografisch gereinigt (Essigsäureethylester/Methanol/Ameisensäure 94:5:1, v:v:v). Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **110** als ein amorpher, weißer Schaum erhalten (281 mg, 0.35 mmol, 57%).

Ausbeute: 31% über 2 Stufen.

$C_{42}H_{48}N_6O_{10}$  (796.86 g·mol<sup>-1</sup>).

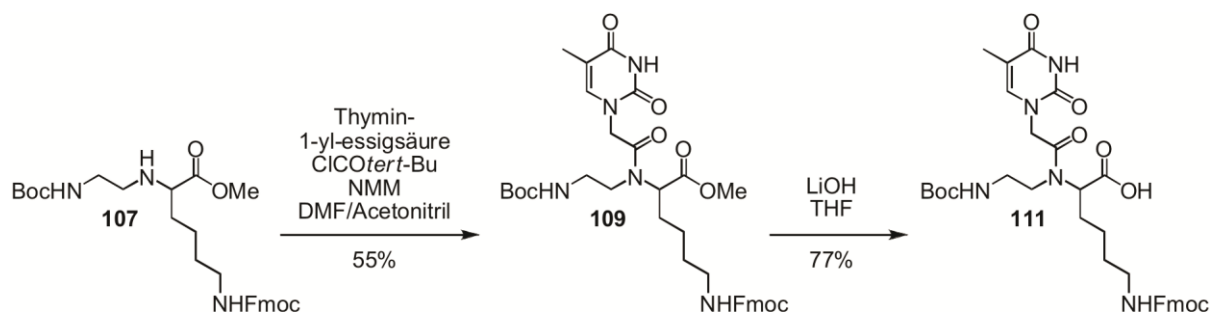
DC:  $R_f$  = 0.26 (Essigsäureethylester/Methanol/Ameisensäure 94:5:1, v:v:v).

ESI-HR-FTMS ( $m/z$ ):  $[M-H]^-$ : 795.3355 (ber.: 795.3359).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, beide Rotamere):  $\delta$  = 1.23–1.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 1.33–1.56 (m, 11H, 3× CH<sub>3</sub>(Boc), CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 1.67–1.91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 2.95–3.48 (m, 6H, 2× CH<sub>2</sub>(Rückgrat), CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 4.20 (t,  $J$  = 6.8, 1H, CH(Fmoc)), 4.29 (d,  $J$  = 6.9, 2H, O–CH<sub>2</sub>(Fmoc)), 4.37 (m, 1H, CH(Rückgrat)), 4.72 und 4.82 (2× s, 2H, CH<sub>2</sub>CO(Methylenlinker)), 5.19 (s, 2H, O–CH<sub>2</sub>(Cbz)), 6.85–6.91 (m, 1H, NH), 7.00 und 7.02 (2× d,  $J$  = 7.3 und 7.3, 1H, CH(Cytosin)), 7.26–7.36 (m, 4H, 4× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.37–7.42 (m, 5H, 5× CH<sub>arom.</sub>(Cbz)), 7.68 (d,  $J$  = 7.3, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.88 (d,  $J$  = 7.5, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.93 und 7.96 (2× d,  $J$  = 7.4 und 7.3, 1H, CH(Cytosin)).

<sup>13</sup>C-NMR (APT, 125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, beide Rotamere):  $\delta$  = 23.0 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 28.0 (3× CH<sub>3</sub>(Boc)), 28.2 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 29.0 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 38.9 (CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 39.9 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 45.6 (CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 46.7 (CH (Fmoc)), 49.8 und 50.1 (CH<sub>2</sub>CO(Methylenlinker)), 58.7 (CH(Rückgrat)), 65.1 (O–CH<sub>2</sub>(Fmoc)), 66.4 (O–CH<sub>2</sub>(Cbz)), 77.9 (C<sub>quat.</sub>(Boc)), 93.7 (CH(Cytosin)), 119.9 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 125.0 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 126.9 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 127.4 (2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 127.8 (2× CH<sub>arom.</sub>(Cbz)), 128.0 (CH<sub>arom.</sub>(Cbz)), 128.3 (2× CH<sub>arom.</sub>(Cbz)), 135.9 (C<sub>quat.</sub>(Cbz)), 140.6 (2× C<sub>quat.</sub>(Fmoc)), 143.8 (2× C<sub>quat.</sub>(Fmoc)), 150.8 (CH(Cytosin)), 153.1 (CO(Cbz)), 154.9 (CO(Cytosin)), 155.6 (CO(Boc)), 156.0 (CO(Fmoc)), 163.1 (C<sub>quat.</sub>(Cytosin)), 167.1 (CH<sub>2</sub>CO(Methylenlinker)), 172.1 (COOH).

### Modifiziertes PNA-Thyminmonomer (111)



In 40 mL wasserfreiem DMF/Acetonitril (1:1, v:v) wurden unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre 1.10 g Thymin-1-yl-essigsäure<sup>[243]</sup> (5.97 mmol) gelöst und auf –15 °C (Eis/Methanol) gekühlt. Anschließend wurden 2.64 mL NMM (24.01 mmol) und nach weiteren

5 min 0.84 mL Pivaloylchlorid (6.83 mmol) zugegeben. Nach 20 min wurde die Suspension mit einer Lösung aus 2.10 g **107** (4.00 mmol) in 10 mL wasserfreiem DMF versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Essigsäureethylester wurde die Lösung 5× mit je 50 mL 0.1 M HCl gewaschen und die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand an Kieselgel adsorbiert und anschließend säulenchromatografisch gereinigt (Essigsäureethylester). Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **109** als ein amorpher, weißer Schaum erhalten (1.52 g, 2.20 mmol, 55%, DC:  $R_f$  = 0.38 (Essigsäureethylester)). Davon wurden 1.48 g (2.14 mmol) in 20 mL THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend tropfenweise mit einem Äquivalent wässriger Lithiumhydroxidlösung (0.2 M) versetzt. Nach 1 h wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mittels DC der Reaktionsumsatz bestimmt. Da noch Edukt vorhanden war, wurden schrittweise weitere 0.2 Äquiv. der Base bis zu einem Maximalwert von 1.6 Äquiv. zugegeben. Nach 5 h wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert und mit 50 mL Wasser versetzt. Die Lösung wurde 6× mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatografisch gereinigt (Essigsäureethylester/Methanol/Ameisensäure 94:5:1, v:v:v). Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **111** als ein amorpher, weißer Schaum erhalten (1.12 g, 1.65 mmol, 77%).

Ausbeute: 42% über 2 Stufen.

$C_{35}H_{43}N_5O_9$  (677.74 g·mol<sup>-1</sup>).

DC:  $R_f$  = 0.46 (Essigsäureethylester/Methanol/Ameisensäure 94:5:1, v:v:v).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M-H]^-$ : 676.2983 (ber.: 676.2988).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, beide Rotamere):  $\delta$  = 1.22–1.51 (m, 13H, 3× CH<sub>3</sub>(Boc), 2× CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 1.67–1.91 (m, 5H, CH<sub>2</sub>(Seitenkette), CH<sub>3</sub>(Thymin)), 2.94–3.47 (m, 6H, 2× CH<sub>2</sub>(Rückgrat), CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 4.19–4.36 (m, 4H, CH(Fmoc), O-CH<sub>2</sub>(Fmoc), CH(Rückgrat)), 4.46–4.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CO(Methylenlinker)), 6.77–6.96 (m, 1H, NH), 7.27–7.42 (m, 6H, 4× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc), CH(Thymin), NH), 7.68 (d, 2H,  $J$  = 7.4, 2H, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 7.88 (d, 2H,  $J$  = 7.4, 2× CH<sub>arom.</sub>(Fmoc)), 11.30 und 11.28 (s, 1H, NH(Thymin)).

<sup>13</sup>C-NMR (APT, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, beide Rotamere):  $\delta$  = 11.8 und 11.9 (CH<sub>3</sub>(Thymin)), 23.2 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 28.1 (3× CH<sub>3</sub>(Boc)), 28.3 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 29.1 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 39.0 (CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 40.0 (CH<sub>2</sub>(Seitenkette)), 45.7 (CH<sub>2</sub>(Rückgrat)), 46.7 (CH(Fmoc)), 48.0 (CH<sub>2</sub>CO(Methylenlinker)), 59.0 (CH(Rückgrat)), 65.1 (O-CH<sub>2</sub>(Fmoc)),



77.6 und 78.0 ( $C_{\text{quat.}}(\text{Boc})$ ), 107.9 ( $C_{\text{quat.}}(\text{Thymin})$ ), 120.0 ( $2 \times \text{CH}_{\text{arom.}}(\text{Fmoc})$ ), 125.1 ( $2 \times \text{CH}_{\text{arom.}}(\text{Fmoc})$ ), 127.0 ( $2 \times \text{CH}_{\text{arom.}}(\text{Fmoc})$ ), 127.5 ( $2 \times \text{CH}_{\text{arom.}}(\text{Fmoc})$ ), 140.7 ( $2 \times C_{\text{quat.}}(\text{Fmoc})$ ), 142.2 ( $\text{CH}(\text{Thymin})$ ), 143.9 ( $2 \times C_{\text{quat.}}(\text{Fmoc})$ ), 150.9 ( $\text{CO}(\text{Thymin})$ ), 155.6 ( $\text{CO}(\text{Boc})$ ), 156.0 ( $\text{CO}(\text{Fmoc})$ ), 164.4 ( $\text{CO}(\text{Thymin})$ ), 167.3 und 167.8 ( $\text{CH}_2\text{CO}(\text{Methylenlinker})$ ), 172.1 und 172.2 ( $\text{COOH}$ ).

#### 6.4.2 Synthese der PNA-Konjugate

##### **H-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (115)**

Die Synthese von **115** wurde an 5  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.124 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) durchgeführt. Der Aufbau der PNA-Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur manuellen Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie unter Verwendung des modifizierten PNA-Monomers **110** an der für die TMR-Anbindung vorgesehenen Position. Anschließend wurde erst Boc-*i*Cys<sup>Ttt</sup>-OH und dann TMR-OH entsprechend den in Kapitel 6.3 genannten Vorschriften gekuppelt. Das Produkt wurde nach Methode B vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{565} = 46.4$  ( $\epsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 510 nmol, 10.2%.

$\text{C}_{129}\text{H}_{157}\text{N}_{61}\text{O}_{31}\text{S}$  ( $3090.08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

HPLC:  $t_R = 9.8 \text{ min}$  (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1030.7 (ber.: 1031.0),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 773.3 (ber.: 773.5),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 618.9 (ber.: 619.0),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 515.9 (ber.: 516.0).

##### **H-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (116)**

Die Synthese von **116** erfolgte an 5  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.124 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **115**.

Ausbeute:  $OD_{565} = 56.1$  ( $\epsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 616 nmol, 12.3%.

$\text{C}_{129}\text{H}_{157}\text{N}_{61}\text{O}_{31}\text{S}$  ( $3090.08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

HPLC:  $t_R = 10.9 \text{ min}$  (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1030.7 (ber.: 1031.0),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 773.3 (ber.: 773.5),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 618.9 (ber.: 619.0),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 515.9 (ber.: 516.0),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 442.4 (ber.: 442.4).

**Ac-gcactettgc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)cca-βAla-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (117)**

Die Synthese von **117** erfolgte durch Umsetzung von 10 nmol des PNA-Thioesters **112**<sup>[243]</sup> mit 10 nmol der *i*Cys-PNA **115** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.2$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 2.1 nmol, 21%.

$\text{C}_{296}\text{H}_{355}\text{N}_{133}\text{O}_{79}\text{S}$  (7071.89 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 14.5$  min (Gradient 3).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 7071.4 (ber.: 7072.9).

**Ac-gcactett((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gcca-βAla-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (118)**

Die Synthese von **118** erfolgte durch Umsetzung von 5 nmol des PNA-Thioesters **113**<sup>[243]</sup> mit 5 nmol der *i*Cys-PNA **115** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.1$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 0.9 nmol, 18%.

$\text{C}_{296}\text{H}_{355}\text{N}_{133}\text{O}_{79}\text{S}$  (7071.89 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 14.6$  min (Gradient 3).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 7069.8 (ber.: 7072.9), das Signal bei 3090.6 stammt von nicht umgesetzter *i*Cys-PNA **115** (ber.: 3091.1), welche durch die HPLC-Reinigung nicht vollständig entfernt werden konnte.

**Ac-gcactettgc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)cca-βAla-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (119)**

Die Synthese von **119** erfolgte durch Umsetzung von 10 nmol des PNA-Thioesters **112**<sup>[243]</sup> mit 10 nmol der *i*Cys-PNA **116** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.3$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 3.5 nmol, 35%.

$\text{C}_{296}\text{H}_{355}\text{N}_{133}\text{O}_{79}\text{S}$  (7071.89 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 15.1$  min (Gradient 3).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 7072.4 (ber.: 7072.9), das Signal bei 3092.4 stammt von nicht umgesetzter *i*Cys-PNA **115** (ber.: 3091.1), welche durch die HPLC-Reinigung nicht vollständig entfernt werden konnte.

**Ac-gcactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)ttgccca-βAla-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (120)**

Die Synthese von **120** erfolgte durch Umsetzung von 10 nmol des PNA-Thioesters **114**<sup>[243]</sup> mit 10 nmol der *i*Cys-PNA **115** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.2$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 1.9 nmol, 19%.

C<sub>296</sub>H<sub>355</sub>N<sub>133</sub>O<sub>79</sub>S (7071.89 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 14.7 \text{ min}$  (Gradient 3).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$ : 7073.0 (ber.: 7072.9).

**Ac-gcactctt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gccca-βAla-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (121)**

Die Synthese von **121** erfolgte durch Umsetzung von 5 nmol des PNA-Thioesters **113**<sup>[243]</sup> mit 5 nmol der *i*Cys-PNA **116** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.1$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 1.0 nmol, 20%.

C<sub>296</sub>H<sub>355</sub>N<sub>133</sub>O<sub>79</sub>S (7071.89 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 14.9 \text{ min}$  (Gradient 3).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$ : 7069.3 (ber.: 7072.9), das Signal bei 3089.9 stammt von nicht umgesetzter *i*Cys-PNA **116** (ber.: 3091.1), welche durch die HPLC-Reinigung nicht vollständig entfernt werden konnte.

**Ac-gcactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)ttgccca-βAla-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (122)**

Die Synthese von **122** erfolgte durch Umsetzung von 10 nmol des PNA-Thioesters **114**<sup>[243]</sup> mit 10 nmol der *i*Cys-PNA **116** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.2$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 2.2 nmol, 22%.

C<sub>296</sub>H<sub>355</sub>N<sub>133</sub>O<sub>79</sub>S (7071.89 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 15.2 \text{ min}$  (Gradient 3).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$ : 7071.4 (ber.: 7072.9), das Signal bei 3091.7 stammt von nicht umgesetzter *i*Cys-PNA **116** (ber.: 3091.1), welche durch die HPLC-Reinigung nicht vollständig entfernt werden konnte.

**H-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (126)**

Die Synthese von **126** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.124 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **115**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Lys<sup>2-Cl-Cbz</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 2.8$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 31 nmol, 1.6%.

C<sub>147</sub>H<sub>193</sub>N<sub>67</sub>O<sub>34</sub>S (3474.60 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 7.8$  min (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+4H]<sup>4+</sup>: 869.4 (ber.: 869.7), [M+5H]<sup>5+</sup>: 695.7 (ber.: 695.9), [M+6H]<sup>6+</sup>: 580.0 (ber.: 580.1), [M+7H]<sup>7+</sup>: 497.3 (ber.: 497.4). Der Signalsatz mit niedrigerer Intensität stammt von einer acetylierten Abbruchsequenz, die kein Isocystein trägt: C<sub>146</sub>H<sub>190</sub>N<sub>66</sub>O<sub>34</sub> (3413.49 g·mol<sup>-1</sup>), [M+5H]<sup>5+</sup>: 684.3 (ber.: 683.7), [M+6H]<sup>6+</sup>: 570.4 (ber.: 569.9), [M+7H]<sup>7+</sup>: 489.2 (ber.: 488.6). Diese konnte durch die HPLC-Reinigung nicht vollständig entfernt werden. Das Chromatogramm deutet auf eine sich am Ende ihrer Lebensdauer befindliche HPLC-Säule hin. Das gleiche trifft für die Verbindungen **127** und **131–133** zu.

**Ac-cccactccatc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (127)**

Die Synthese von **127** wurde an 2 µmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.103 mmol·g<sup>-1</sup>) durchgeführt. Zum Abspalten der Trityl-Schutzgruppe wurde das Harz gewaschen (5× DMF, 10× DCM, je 1 mL), 2× 15 min in TFA/TIS (19:1, v:v) geschüttelt und erneut gewaschen (10× DCM, 5× DMF, je 1 mL). Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur manuellen Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie unter Verwendung des geschützten Aminosäurebausteins Boc-βAla-OH sowie des modifizierten PNA-Monomers **102**<sup>[243]</sup> an der für die FAM-Anbindung vorgesehenen Position. Anschließend wurde der N-Terminus acetyliert und dann FAM-OH entsprechend der in Kapitel 6.3 genannten Vorschrift gekuppelt. Das Produkt wurde nach Methode A vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{492} = 1.6$  ( $\varepsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 20 nmol, 1.0%.

C<sub>182</sub>H<sub>220</sub>N<sub>82</sub>O<sub>51</sub>S (4404.28 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 1.6$  min (Gradient 9).

MALDI/TOF-MS ( $m/z$ ): [M+H]<sup>+</sup>: 4408.6 (ber.: 4405.3).

**H-*i*Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgt-Gly-NH<sub>2</sub> (128)**

Die Synthese von **128** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.124 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **115**.

Ausbeute:  $OD_{565} = 14.7$  ( $\epsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 162 nmol, 8.1%.

C<sub>131</sub>H<sub>163</sub>N<sub>47</sub>O<sub>39</sub>S (3052.05 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 13.0$  min (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1526.5 (ber.: 1527.0), [M+3H]<sup>3+</sup>: 1018.1 (ber.: 1018.4), [M+4H]<sup>4+</sup>: 763.8 (ber.: 764.0), [M+5H]<sup>5+</sup>: 611.2 (ber.: 611.4).

**Ac-(Lys)<sub>5</sub>-ccactccatc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (129)**

Die Synthese von **129** erfolgte an 4 µmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.103 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **127**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Lys<sup>2-Cl-Cbz</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{492} = 8.8$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 113 nmol, 2.8%.

C<sub>202</sub>H<sub>267</sub>N<sub>87</sub>O<sub>53</sub>S (4793.90 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.10$  min (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+4H]<sup>4+</sup>: 1199.2 (ber.: 1199.5), [M+5H]<sup>5+</sup>: 959.6 (ber.: 959.8), [M+6H]<sup>6+</sup>: 800.0 (ber.: 800.0), [M+7H]<sup>7+</sup>: 685.8 (ber.: 685.9), [M+8H]<sup>8+</sup>: 600.4 (ber.: 600.2).

**H-*i*Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgta-(Lys)<sub>5</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (130)**

Die Synthese von **130** erfolgte an 3.5 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.124 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Lys<sup>2-Cl-Cbz</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 35.2$  ( $\epsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 386 nmol, 11.0%.

C<sub>172</sub>H<sub>236</sub>N<sub>64</sub>O<sub>46</sub>S (3968.18 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.24$  min (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+3H]<sup>3+</sup>: 1323.2 (ber.: 1323.7), [M+4H]<sup>4+</sup>: 992.8 (ber.: 993.1), [M+5H]<sup>5+</sup>: 794.6 (ber.: 794.6), [M+6H]<sup>6+</sup>: 662.4 (ber.: 662.4), [M+7H]<sup>7+</sup>: 568.0 (ber.: 567.9).

**Ac-cccactecat((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)cgag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (131)**

Die Synthese von **131** erfolgte an 5 μmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.103 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **127**. Es wurde das modifizierte PNA-Monomer **103**<sup>[243]</sup> an der für die FAM-Anbindung vorgesehenen Position verwendet.

Ausbeute:  $OD_{492} = 5.0$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 64 nmol, 1.3%.

C<sub>182</sub>H<sub>220</sub>N<sub>82</sub>O<sub>51</sub>S (4404.28 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 14.5$  min (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+4H]<sup>4+</sup>: 1101.9 (ber.: 1102.1), [M+5H]<sup>5+</sup>: 881.7 (ber.: 881.9), [M+6H]<sup>6+</sup>: 735.0 (ber.: 735.1), [M+7H]<sup>7+</sup>: 630.1 (ber.: 630.2), [M+8H]<sup>8+</sup>: 551.5 (ber.: 551.5).

**Ac-cccactec((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)atcgag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (132)**

Die Synthese von **132** erfolgte an 5 μmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.103 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **127**.

Ausbeute:  $OD_{492} = 3.4$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 44 nmol, 0.9%.

C<sub>182</sub>H<sub>220</sub>N<sub>82</sub>O<sub>51</sub>S (4404.28 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 14.5$  min (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+4H]<sup>4+</sup>: 1101.9 (ber.: 1102.1), [M+5H]<sup>5+</sup>: 881.7 (ber.: 881.9), [M+6H]<sup>6+</sup>: 735.0 (ber.: 735.1), [M+7H]<sup>7+</sup>: 630.1 (ber.: 630.2).

**Ac-cccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (133)**

Die Synthese von **133** erfolgte an 5 μmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.103 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **127**.

Ausbeute:  $OD_{492} = 4.4$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 57 nmol, 1.1%.

C<sub>182</sub>H<sub>220</sub>N<sub>82</sub>O<sub>51</sub>S (4404.28 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 12.5$  min (Gradient 9).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.00$  min (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+4H]<sup>4+</sup>: 1101.9 (ber.: 1102.1), [M+5H]<sup>5+</sup>: 881.7 (ber.: 881.9), [M+6H]<sup>6+</sup>: 735.0 (ber.: 735.1), [M+7H]<sup>7+</sup>: 630.1 (ber.: 630.2).

**H-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (134)**

Die Synthese von **134** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.124 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**.

Ausbeute:  $OD_{565} = 4.7$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 52 nmol, 2.6%.

C<sub>153</sub>H<sub>189</sub>N<sub>61</sub>O<sub>44</sub>S (3618.58 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 12.1$  min (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+3H]<sup>3+</sup>: 1206.9 (ber.: 1207.2), [M+4H]<sup>4+</sup>: 905.5 (ber.: 905.7), [M+5H]<sup>5+</sup>: 724.6 (ber.: 724.7), [M+6H]<sup>6+</sup>: 604.0 (ber.: 604.1).

**H-*i*Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (135)**

Die Synthese von **135** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.124 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**.

Ausbeute:  $OD_{565} = 2.2$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 24 nmol, 1.2%.

C<sub>153</sub>H<sub>189</sub>N<sub>61</sub>O<sub>44</sub>S (3618.58 g·mol<sup>-1</sup>).

HPLC:  $t_R = 12.3$  min (Gradient 9).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+3H]<sup>3+</sup>: 1206.9 (ber.: 1207.2), [M+4H]<sup>4+</sup>: 905.4 (ber.: 905.7), [M+5H]<sup>5+</sup>: 724.6 (ber.: 724.7), [M+6H]<sup>6+</sup>: 604.0 (ber.: 604.1).

**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-SR (136)**

Die Synthese des PNA-Mercaptopropionsäurethioesters **136** (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub>) erfolgte an 10 µmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.103 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **127**.

Ausbeute:  $OD_{492} = 12.6$  ( $\varepsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 161 nmol, 1.6%.

C<sub>183</sub>H<sub>220</sub>N<sub>84</sub>O<sub>50</sub>S (4428.30 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.03$  min (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+3H]<sup>3+</sup>: 1476.4 (ber.: 1477.1), [M+4H]<sup>4+</sup>: 1107.6 (ber.: 1108.1).

Der Mercaptopropionsäurethioester wurde anschließend nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von PNA-MESNA-Thioestern durch Umthioesterung in den entsprechenden MESNA-Thioester (R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H) überführt.

$C_{180}H_{215}N_{82}O_{51}S_2$  (4407.28 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R$  = 1.19 min (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 1470.2 (ber.: 1470.1),  $[M+4H]^{4+}$ : 1102.9 (ber.: 1102.8),  $[M+5H]^{5+}$ : 882.5 (ber.: 882.5),  $[M+6H]^{6+}$ : 735.7 (ber.: 735.6),  $[M+7H]^{7+}$ : 630.8 (ber.: 630.6).

### **H-Cys-t((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ttctctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (137)**

Die Synthese von **137** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.144 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde das modifizierte PNA-Monomer **111** an der für die TMR-Anbindung vorgesehenen Position sowie der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565}$  = 12.4 ( $\varepsilon_{565}$  = 91000 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), 136 nmol, 6.8%.

$C_{153}H_{189}N_{61}O_{44}S$  (3618.58 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R$  = 1.30 min (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+2H]^{2+}$ : 1809.2 (ber.: 1810.3),  $[M+3H]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[M+4H]^{4+}$ : 905.6 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-tt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (138)**

Die Synthese von **138** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.144 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde das modifizierte PNA-Monomer **111** an der für die TMR-Anbindung vorgesehenen Position sowie der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565}$  = 3.3 ( $\varepsilon_{565}$  = 91000 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), 36 nmol, 1.8%.

$C_{153}H_{189}N_{61}O_{44}S$  (3618.58 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R$  = 1.27 min (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+2H]^{2+}$ : 1809.0 (ber.: 1810.3),  $[M+3H]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[M+4H]^{4+}$ : 905.4 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-ttt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ctctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (139)**

Die Synthese von **139** erfolgte an 2 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.144 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde das modifizierte PNA-Monomer **111** an der für die TMR-Anbindung vorgesehenen Position sowie der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.



Ausbeute:  $OD_{565} = 3.6$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 40 nmol, 2.0%.

$\text{C}_{153}\text{H}_{189}\text{N}_{61}\text{O}_{44}\text{S}$  ( $3618.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.24 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1809.2 (ber.: 1810.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 905.4 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (140)**

Die Synthese von **140** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 12.2$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 134 nmol, 6.7%.

$\text{C}_{153}\text{H}_{189}\text{N}_{61}\text{O}_{44}\text{S}$  ( $3618.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.22 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1809.4 (ber.: 1810.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 905.4 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-tttct((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (141)**

Die Synthese von **141** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde das modifizierte PNA-Monomer **111** an der für die TMR-Anbindung vorgesehenen Position sowie der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 13.6$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 149 nmol, 7.5%.

$\text{C}_{153}\text{H}_{189}\text{N}_{61}\text{O}_{44}\text{S}$  ( $3618.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.20 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1809.2 (ber.: 1810.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 905.4 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (142)**

Die Synthese von **142** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 7.8$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 86 nmol, 4.3%.

$\text{C}_{153}\text{H}_{189}\text{N}_{61}\text{O}_{44}\text{S}$  ( $3618.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.22 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1809.0 (ber.: 1810.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 905.2 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-tttctct((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gtag-Gly-NH<sub>2</sub> (143)**

Die Synthese von **143** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde das modifizierte PNA-Monomer **111** an der für die TMR-Anbindung vorgesehenen Position sowie der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 4.2$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 46 nmol, 2.3%.

$\text{C}_{153}\text{H}_{189}\text{N}_{61}\text{O}_{44}\text{S}$  ( $3618.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.19 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1808.8 (ber.: 1810.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1206.6 (ber.: 1207.2),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 905.2 (ber.: 905.7).

### **H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgttagcttag-Gly-NH<sub>2</sub> (144)**

Die Synthese von **144** erfolgte an 2.25  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 4.9$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 54 nmol, 2.4%.

$\text{C}_{196}\text{H}_{242}\text{N}_{84}\text{O}_{56}\text{S}$  ( $4702.61 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.20 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1568.0 (ber.: 1568.5),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1176.2 (ber.: 1176.7).

### **H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgttag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (145)**

Die Synthese von **145** erfolgte an 5  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 60.6$  ( $\varepsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 666 nmol, 13.3%.

$\text{C}_{171}\text{H}_{225}\text{N}_{67}\text{O}_{47}\text{S}$  ( $4003.10 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.17 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1001.6 (ber.: 1001.8),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 801.5 (ber.: 801.6),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 668.2 (ber.: 668.2),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 572.9 (ber.: 572.9).

### **H-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>)actgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (146)**

Die Synthese von **146** erfolgte an 2.5  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Nach dem Aufbau der PNA-Sequenz wurde die Fmoc-Gruppe vom modifizierten PNA-Monomer **110** durch Schütteln in Piperidin/DMF (1:4, v:v,  $4 \times 5 \text{ min}$ , je 1 mL) abgespalten und das Produkt nach Methode A der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift vom Harz freigesetzt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 54.7$  ( $\varepsilon_{260} = 102900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 532 nmol, 21.3%.

$\text{C}_{143}\text{H}_{199}\text{N}_{67}\text{O}_{40}$  ( $3496.53 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.63 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1748.2 (ber.: 1749.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1166.0 (ber.: 1166.5),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 875.0 (ber.: 875.1).

### **Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga- $\beta$ Ala-OH (147)**

20 nmol **136** wurden in 100  $\mu\text{L}$  0.1 M NaOH gelöst und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  TFA zugesetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 100  $\mu\text{L}$  Wasser/Acetonitril/TFA (98:1:1, v:v:v) aufgenommen und mittels analytischer HPLC gereinigt (Gradient 3).

Ausbeute: quantitativ.

$\text{C}_{178}\text{H}_{212}\text{N}_{82}\text{O}_{49}$  ( $4284.11 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.03 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1072.0 (ber.: 1072.0),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 857.8 (ber.: 857.8),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 715.1 (ber.: 715.0),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 613.1 (ber.: 613.0).

---

**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (148)**

Die Synthese von **148** erfolgte durch Umsetzung von 30 nmol des PNA-βAla-Thioesters **136** mit 30 nmol der Cys-PNA **145** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.1$  ( $\varepsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 1.3 nmol, 4.4%.

$\text{C}_{349}\text{H}_{435}\text{N}_{149}\text{O}_{95}\text{S}$  ( $8269.19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.19 \text{ min}$  (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 1379.0 (ber.: 1379.2),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 1182.2 (ber.: 1182.3),  $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ : 1034.6 (ber.: 1034.7),  $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$ : 919.9 (ber.: 919.8).

**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-SR (149)**

Die Synthese des PNA-Mercaptopropionsäurethioesters **149** ( $\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{CO-Gly-NH}_2$ ) erfolgte an 5 μmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.103 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **127**. Zum Aufbau des Thioesters wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Gly-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{492} = 8.0$  ( $\varepsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 103 nmol, 2.1%.

$\text{C}_{182}\text{H}_{218}\text{N}_{84}\text{O}_{50}\text{S}$  ( $4414.28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.02 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1471.8 (ber.: 1472.4),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1104.2 (ber.: 1104.6).

Der Mercaptopropionsäurethioester wurde anschließend nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von PNA-MESNA-Thioestern durch Umthioesterung in den entsprechenden MESNA-Thioester ( $\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ ) überführt.

$\text{C}_{179}\text{H}_{213}\text{N}_{82}\text{O}_{51}\text{S}_2$  ( $4393.26 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.10 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1099.4 (ber.: 1099.3),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 879.8 (ber.: 879.7),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 733.3 (ber.: 733.2),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 628.7 (ber.: 628.6).

**H-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (150)**

Die Synthese von **150** erfolgte an 5 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.144 mmol·g<sup>-1</sup>) analog zu der von Verbindung **128**.

Ausbeute:  $OD_{565} = 64.5$  ( $\epsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 709 nmol, 14.2%.

C<sub>171</sub>H<sub>225</sub>N<sub>67</sub>O<sub>47</sub>S (4003.10 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.19 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+3H]<sup>3+</sup>: 1335.1 (ber.: 1335.4), [M+4H]<sup>4+</sup>: 1001.8 (ber.: 1001.8), [M+5H]<sup>5+</sup>: 801.5 (ber.: 801.6), [M+6H]<sup>6+</sup>: 668.2 (ber.: 668.2), [M+7H]<sup>7+</sup>: 572.9 (ber.: 572.9), [M+8H]<sup>8+</sup>: 501.5 (ber.: 501.4).

**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (151)**

Die Synthese von **151** erfolgte durch Umsetzung von 30 nmol des PNA-βAla-Thioesters **136** mit 30 nmol der *i*Cys-PNA **150** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.3$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 3.3 nmol, 11.1%.

C<sub>349</sub>H<sub>435</sub>N<sub>149</sub>O<sub>95</sub>S (8269.19 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.15 \text{ min}$  (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+6H]<sup>6+</sup>: 1378.9 (ber.: 1379.2), [M+7H]<sup>7+</sup>: 1182.1 (ber.: 1182.3), [M+8H]<sup>8+</sup>: 1034.5 (ber.: 1034.7), [M+9H]<sup>9+</sup>: 919.7 (ber.: 919.8).

**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (152)**

Die Synthese von **152** erfolgte durch Umsetzung von 30 nmol des PNA-Gly-Thioesters **149** mit 30 nmol der Cys-PNA **145** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.4$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 5.8 nmol, 19.2%.

C<sub>348</sub>H<sub>433</sub>N<sub>149</sub>O<sub>95</sub>S (8255.17 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.15 \text{ min}$  (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+6H]<sup>6+</sup>: 1376.3 (ber.: 1376.9), [M+7H]<sup>7+</sup>: 1180.1 (ber.: 1180.3), [M+8H]<sup>8+</sup>: 1032.8 (ber.: 1032.9), [M+9H]<sup>9+</sup>: 918.1 (ber.: 918.2).

**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (153)**

Die Synthese von **153** erfolgte durch Umsetzung von 30 nmol des PNA-Gly-Thioesters **149** mit 30 nmol der *i*Cys-PNA **150** entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift zur Synthese von Verknüpfungsprodukten.

Ausbeute:  $OD_{492} = 0.6$  ( $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 7.5 nmol, 25.1%.

$\text{C}_{348}\text{H}_{433}\text{N}_{149}\text{O}_{95}\text{S}$  ( $8255.17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.15 \text{ min}$  (Gradient 14).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 1376.8 (ber.: 1376.9),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 1180.3 (ber.: 1180.3),  $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ : 1032.8 (ber.: 1032.9),  $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$ : 918.1 (ber.: 918.2).

**H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)actgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (155)**

Die Synthese von **155** erfolgte an 2.5  $\mu\text{mol}$  mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.144 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **128**. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Boc-Cys<sup>Ttt</sup>-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{565} = 18.0$  ( $\epsilon_{565} = 91000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 198 nmol, 7.9%.

$\text{C}_{171}\text{H}_{224}\text{N}_{70}\text{O}_{45}\text{S}$  ( $4012.11 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.08 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1003.9 (ber.: 1004.0),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 803.3 (ber.: 803.4),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 669.7 (ber.: 669.7),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 574.3 (ber.: 574.2).

### 6.4.3 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der Verknüpfungsprodukte und Sondenpaare

Alle Arbeiten wurden unter einem Strom von Argon durchgeführt. Es wurden entgaste und anschließend mit Argon gesättigte Puffer verwendet. Die Verknüpfungsprodukte wurden mit der angegebenen Konzentration in Puffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa, 150 mM NaCl, pH 7.4) gelöst. Je 1 mL der Lösungen wurde in Fluoreszenzküvetten überführt, im Fluoreszenzspektrometer platziert und auf eine Temperatur von 90 °C erhitzt. Nach Aufnahme der Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{\text{ex.}} = 470 \text{ nm}$ ) wurde die Temperatur um 10 °C vermindert und nach 2 min erneut gemessen. Diese Vorgehensweise wurde bis zu einer Temperatur von 20 °C wiederholt. Anschließend wurde das DNA-Templat (je 1 Äquiv.) zugegeben, auf 90 °C erhitzt und unter identischen Bedingungen erneut gemessen. Mit den Sondenpaaren in Kapitel 4.2.3

wurde äquivalent verfahren. Um jedoch eine Reaktion während der Fluoreszenzmessungen zu verhindern, wurden die FAM-markierten PNA-Thioester **112–114**<sup>[243]</sup> zuvor hydrolysiert. Dazu wurden jeweils 100 pmol der Thioester mit 1 µL 2 M NaOH versetzt und 1 h geschüttelt. Anschließend wurde mit TFA neutralisiert und auf 1 mL mit einer Lösung der jeweiligen TMR-markierten *i*Cys-PNA (100 nM) in Puffer aufgefüllt.

#### 6.4.4 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfungsreaktionen

*Verfolgung der Verknüpfungsreaktionen am Fluoreszenzspektrometer:* Alle Arbeiten wurden unter einem Strom von Argon durchgeführt. Es wurden entgaste und anschließend mit Argon gesättigte Puffer verwendet. Der jeweilige PNA-Thioester wurde mit der doppelten Zielkonzentration (2 µM) in Puffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MESNa oder 10 mM MPAA, 150 mM NaCl, pH 7.4) gelöst und 3 h (wenn Mercaptopropionsäurethioester verwendet wurden) oder 1 h (wenn MESNA-Thioester verwendet wurden) bei Raumtemperatur equilibriert. Um eventuell gebildete Disulfide zu reduzieren, wurde die jeweilige (Iso)cysteinyl-PNA ebenfalls mit der doppelten Zielkonzentration (2 µM) im gleichen Puffer gelöst und 1 h bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden gleiche Volumina beider Lösungen vereint und auf Fluoreszenzküvetten aufgeteilt (je 1 mL; die Versuche aus Kapitel 4.2.7 wurden in 130 µL Reaktionsvolumen in 150 µL Fluoreszenzküvetten durchgeführt). Für Reaktionen in Gegenwart der kompetitiven PNA **146** (Kapitel 4.2.11) wurde diese zu den Lösungen in den Küvetten gegeben (je 5 Äquiv., 5 µM). Die Küvetten wurden im Fluoreszenzspektrometer platziert, auf die jeweilige Reaktionstemperatur erwärmt und 2 min equilibriert. H-Ras-Template: Von jeder Lösung wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen ( $\lambda_{ex.} = 470$  nm) und dann die DNA-Template (je 1 Äquiv., 1 µM) zugegeben. Die Reaktionen wurden 1 h im Kinetikmodus verfolgt ( $\lambda_{ex.} = 470$  nm,  $\lambda_{em.} = 523$  nm (FAM), 585 nm (TMR)). B-Raf-Template: Die Messungen wurden im Kinetikmodus gestartet und nach 2 min pausiert. Die DNA-Template wurden zugegeben (je 1 Äquiv., 1 µM) und die Messungen 1 h fortgesetzt. Um die relative Änderung des Fluoreszenzintensitätenverhältnisses zu erhalten, wurde für jeden Zeitpunkt der Quotient  $(F_{585}/F_{523})_t / (F_{585}/F_{523})_{t=0}$  berechnet. Das Verhältnis aus TMR- und FAM-Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurde aus den vor Zugabe der DNA gemessenen Fluoreszenzspektren (H-Ras-Template) oder aus dem ersten gemessenen Wert in der 2 min-Phase vor Zugabe der DNA (B-Raf-Template) berechnet. Die Anfangsraten der Signalanstiege wurden über die Steigungen von Regressionsgeraden im quasi-linearen Anfangsbereich der Verknüpfungsreaktionen bestimmt.

*Verfolgung der Verknüpfungsreaktionen während der PCR:* Die PNA-Konjugate wurden in 20-facher Zielkonzentration einzeln unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Puffer (100 mM TRIS, 10 mM MESNa, pH 8.5 bei 25 °C) gelöst und 1 h bei Raumtemperatur equilibriert. Zur Herstellung des Mastermixes wurde eine Lösung aus entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Wasser, Reaktionspuffer *high specificity S* (Endkonzentration: 1×), *enhancer solution P* (Endkonzentration: 1×), Magnesiumchlorid (Endkonzentration: 2.5 mM), dNTP-Mix *long range* (Endkonzentration: 200 µM pro dNTP), *Taq*-DNA-Polymerase (Endkonzentration: 1 u), sowie den Primern in den jeweils angegebenen Konzentrationen auf Eis vorbereitet. Das erste PNA-Konjugat wurde anschließend in 20-facher Verdünnung in den Mastermix gegeben und geschüttelt, bevor die Zugabe des zweiten PNA-Konjugats erfolgte (Endkonzentration: 200 nM bzw. 300 nM). Dadurch sollten templatunabhängige Verknüpfungsreaktionen bei höheren Konzentrationen verhindert werden. Bei den Versuchen aus Kapitel 4.2.16 wurde statt der PNA-Konjugate SYBR<sup>®</sup> Gold (Endkonzentration: 1×) verwendet. Der Mastermix wurde aufgeteilt und die jeweiligen Mengen der humanen, genomischen DNA-Template bzw. Wasser (NTCs) zugegeben. 3× 20 µL jeder Reaktionsmischung (Dreifachmessung) wurden in ein *well plate* pipettiert, mit einer hitzebeständigen Klarsichtfolie versiegelt und 20 s zentrifugiert (1300 rpm), um Luftblasen zu zerstören. Das Temperaturprogramm der PCR umfasste eine initiale Denaturierung bei 95 °C (20 s), gefolgt von 40–70 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 10 s), Primeranlagerung (50 °C, 20–30 s) und Elongation (72 °C, 20 s) sowie finales Abkühlen auf 4 °C bis die PCR-Mischungen über Gelelektrophorese analysiert wurden. Die Fluoreszenzmessungen fanden während der Anlagerungsphase jedes Zyklus statt. Um das normalisierte FRET-Signal zu erhalten, wurde der Quotient  $(F_{585}/F_{523})_{\text{Zyklus}}/(F_{585}/F_{523})_{\text{Zyklus } 20}$  für jeden Zyklus berechnet (der Nenner wurde aus dem in Zyklus 20 berechneten Wert gebildet, bei dem die Menge des gebildeten PCR-Produkts noch sehr gering ist) und auf den Maximalwert (als 1 gesetzt) und den Wert aus Zyklus 20 (als 0 gesetzt) innerhalb eines Experiments normalisiert. In den Abbildungen wurde immer eine repräsentative Kurve gezeigt.

### 6.4.5 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte

Für ein 15 cm langes Trenngel (8% Acrylamid) wurden 12 mL 20% Acrylamidpuffer auf 30 mL mit 0.5× TBE-Puffer aufgefüllt und 5 min zentrifugiert (4300 rpm), um Luftblasen zu zerstören. 150 µL einer wässrigen Ammoniumpersulfatlösung (1:9, *m:v*) und 30 µL Tetramethylethyldiamin wurden zugegeben und die Lösung zwischen zwei mit Gummi-



dichtungen versehene Glasplatten gegossen. Nachdem die Polymerisation beendet war, wurde das Trenngel mit einem 1 cm langen Sammelgel (5% Acrylamid: 2 mL 20% Acrylamidpuffer aufgefüllt auf 8 mL mit 0.5× TBE-Puffer, 40 µL Ammoniumpersulfatlösung (1:9, *m:v*), 8 µL Tetramethylethyldiamin) überschichtet. 5 µL der PCR-Lösungen wurden mit 1 µL Lade-puffer (Konzentrat: 6×) versehen und in die Geltaschen pipettiert. In jedem Gel wurde mindestens eine Tasche mit einer Oligonukleotidleiter beladen. Die gelelektrophoretischen Trennungen wurden in einer mit 0.5× TBE-Puffer gefüllten Gelkammer bei 150–300 V 1.5–2 h bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Gele aus den Glasplatten entfernt, 20 min unter Lichtausschluss mit 20 mL einer SYBR<sup>®</sup> Gold-Lösung (Endkonzentration: 1×) in 0.5× TBE-Puffer behandelt und am Bildgebungsgerät ausgelesen.

## 6.5 Versuche zu den PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen

### 6.5.1 Synthese der PNA-Konjugate

#### IAc-tcttccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (156)

Die Synthese von **156** wurde an 6 µmol mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.248 mmol·g<sup>-1</sup>) durchgeführt. Zum Abspalten der Trityl-Schutzgruppe wurde das Harz gewaschen (5× DMF, 10× DCM, je 1 mL), 2× 15 min in TFA/TIS (19:1, *v:v*) geschüttelt und erneut gewaschen (10× DCM, 5× DMF, je 1 mL). Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur manuellen Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie unter Verwendung des geschützten Aminosäurebausteins Boc-Gly-OH. Nach der Kupplung des letzten PNA-Monomers wurde 1 µmol (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) abgenommen und für die weitere Synthese verwendet. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde das Harz mit Iodessigsäure nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde nach Methode A vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 23.8$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 294 nmol, 29.4%.

C<sub>113</sub>H<sub>147</sub>N<sub>52</sub>O<sub>36</sub>SI (2968.67 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.19$  min (Gradient 12).

ESI-MS (*m/z*): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1485.1 (ber.: 1485.3), [M+3H]<sup>3+</sup>: 990.4 (ber.: 990.6), [M+4H]<sup>4+</sup>: 743.2 (ber.: 743.2), [M+5H]<sup>5+</sup>: 594.8 (ber.: 594.7), [M+6H]<sup>6+</sup>: 495.8 (ber.: 495.8).

**IAc-tettccccac-Gly-S(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)CH<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (157)**

Die Synthese von **157** wurde an 5 µmol mit Fmoc-Gly-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.248 mmol·g<sup>-1</sup>) durchgeführt. Nach der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz 2× 30 min in einer Lösung aus 4 Äquiv. *S*-Trt-4-Mercapto-phenylethylsäure (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 8 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt und gewaschen (5× DMF, 10× DCM, je 1 mL). Zum Abspalten der Trityl-Schutzgruppe wurde das Harz 2× 15 min in TFA/TIS (19:1, v:v) geschüttelt und gewaschen (10× DCM, 5× DMF, je 1 mL). Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur manuellen Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie unter Verwendung des geschützten Aminosäurebausteins Boc-Gly-OH. Nach der Kupplung des letzten PNA-Monomers wurde 1 µmol (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) abgenommen und für die weitere Synthese verwendet. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde das Harz mit Iodessigsäure nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde nach Methode A vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 5.3$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 66 nmol, 6.6%.

C<sub>118</sub>H<sub>149</sub>N<sub>52</sub>O<sub>36</sub>SI (3030.74 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.27 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1516.3 (ber.: 1516.4), [M+3H]<sup>3+</sup>: 1011.1 (ber.: 1011.3), [M+4H]<sup>4+</sup>: 758.6 (ber.: 758.7), [M+5H]<sup>5+</sup>: 607.3 (ber.: 607.2), [M+6H]<sup>6+</sup>: 506.2 (ber.: 506.1).

**H-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (158)**

Die Synthese von **158** wurde an 5 µmol mit Fmoc-Cys<sup>Trt</sup>-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.255 mmol·g<sup>-1</sup>) durchgeführt. Der Aufbau der PNA-Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Anschließend wurde das Harz in einen Spritzenreaktor überführt und der geschützte Aminosäurebaustein Boc-*i*Cys<sup>Trt</sup>-OH entsprechend der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift gekuppelt. Das Produkt wurde nach Methode B vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 64.9$  ( $\epsilon_{260} = 66300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 979 nmol, 19.6%.

C<sub>80</sub>H<sub>105</sub>N<sub>43</sub>O<sub>22</sub>S<sub>2</sub> (2085.09 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.90 \text{ min}$  (Gradient 10).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+2H]^{2+}$ : 1043.3 (ber.: 1043.6),  $[M+3H]^{3+}$ : 695.9 (ber.: 696.0),  $[M+4H]^{4+}$ : 522.4 (ber.: 522.3),  $[M+5H]^{5+}$ : 418.1 (ber.: 418.0).

### IAc-tcttccccac-Gly-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (**159**)

Die Synthese von **159** wurde an 5  $\mu$ mol mit Fmoc-Cys<sup>Trit</sup>-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad: 0.255 mmol·g<sup>-1</sup>) durchgeführt. Der Aufbau des ersten PNA-Segments erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Anschließend wurde das Harz in einen Spritzenreaktor überführt und die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Schütteln in Piperidin/DMF (1:4, v:v, 2× 3 min, je 1 mL) entfernt. Das Harz wurde gewaschen (10× DMF, je 1 mL) und 4× 30 min in einer Lösung aus 4 Äquiv. Fmoc-*i*Cys<sup>Trit</sup>-OH<sup>[281]</sup> (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 8 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt. Es wurde erneut gewaschen (5× DMF, je 1 mL) und 3 min in 1 mL DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, v:v:v) geschüttelt. Das Harz wurde gewaschen (10× DMF, je 1 mL) und die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Schütteln in Piperidin/DMF (1:4, v:v, 2× 3 min, je 1 mL) entfernt. Es wurde erneut gewaschen (10× DMF, je 1 mL) und 4× 30 min in einer Lösung aus 4 Äquiv. Fmoc-Gly-OH (Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 8 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt. Nach dem Waschen (5× DMF, je 1 mL) wurde 3 min in 1 mL DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, v:v:v) geschüttelt. Das Harz wurde gewaschen (10× DMF, je 1 mL), in einen Reaktor für die automatisierte Festphasensynthese überführt und im Syntheseautomaten platziert. Der Aufbau des zweiten PNA-Segments erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Nach der Kupplung des letzten PNA-Monomers wurde 1  $\mu$ mol (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) abgenommen und für die weitere Synthese in einen Spritzenreaktor überführt. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde das Harz mit Iodessigsäure nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde nach Methode B vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 5.1$  ( $\epsilon_{260} = 146900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 35 nmol, 3.5%.

C<sub>188</sub>H<sub>242</sub>N<sub>93</sub>O<sub>56</sub>S<sub>2</sub>I (**159**, 4891.56 g·mol<sup>-1</sup>), C<sub>188</sub>H<sub>241</sub>N<sub>93</sub>O<sub>56</sub>S<sub>2</sub> (**160**, 4763.65 g·mol<sup>-1</sup>).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.41$  oder 1.38 min (**159**), 1.27 (**160**, Gradient 10). Die Herkunft des dritten Signals ist unbekannt.

ESI-MS ( $m/z$ ): **159**:  $[M+4H]^{4+}$ : 1223.3 (ber.: 1223.9),  $[M+5H]^{5+}$ : 979.0 (ber.: 979.3),

$[M+6H]^{6+}$ : 815.9 (ber.: 816.3),  $[M+7H]^{7+}$ : 699.5 (ber.: 699.8). Der Signalsatz mit höherer Intensität stammt von der zyklischen PNA **160**, welche durch die teilweise Zyklisierung von **159** in der sauren Stammlösung gebildet wurde:  $[M+4H]^{4+}$ : 1191.7 (ber.: 1191.7),  $[M+5H]^{5+}$ : 953.8 (ber.: 953.7),  $[M+6H]^{6+}$ : 794.9 (ber.: 794.9),  $[M+7H]^{7+}$ : 681.7 (ber.: 681.5).

#### **ClAc-tettccccac-Gly-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (161)**

Die Synthese von **161** erfolgte an 1  $\mu$ mol des aus der Synthese von **159** zurückgelegten Harzes. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde Chloressigsäure verwendet.

Ausbeute:  $OD_{260} = 7.9$  ( $\varepsilon_{260} = 146900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 54 nmol, 5.4%.

$\text{C}_{188}\text{H}_{242}\text{N}_{93}\text{O}_{56}\text{S}_2\text{Cl}$  ( $4800.11 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.37 \text{ min}$  (Gradient 10).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+4H]^{4+}$ : 1200.8 (ber.: 1201.0),  $[M+5H]^{5+}$ : 961.0 (ber.: 961.0),  $[M+6H]^{6+}$ : 800.9 (ber.: 801.0),  $[M+7H]^{7+}$ : 686.8 (ber.: 686.7).

#### **Ac-tettccccac-Gly-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (162)**

Die Synthese von **162** erfolgte an 1  $\mu$ mol des aus der Synthese von **159** zurückgelegten Harzes. Der N-Terminus wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift acetyliert.

Ausbeute:  $OD_{260} = 5.1$  ( $\varepsilon_{260} = 146900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 35 nmol, 3.5%.

$\text{C}_{188}\text{H}_{243}\text{N}_{93}\text{O}_{56}\text{S}_2$  ( $4765.66 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.28 \text{ min}$  (Gradient 10).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+4H]^{4+}$ : 1192.1 (ber.: 1192.4),  $[M+5H]^{5+}$ : 954.1 (ber.: 954.1),  $[M+6H]^{6+}$ : 795.2 (ber.: 795.3),  $[M+7H]^{7+}$ : 681.8 (ber.: 681.8).

#### **Ac-tettccccacacctacag-Gly-NH<sub>2</sub> (163)**

Die Synthese von **163** wurde an 2  $\mu$ mol unbeladenem Tentagel<sup>®</sup> Rink Amid-Harz (Linker:  $0.180 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) durchgeführt. Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Fmoc-Gly-OH verwendet. Der N-Terminus wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift acetyliert. Das Produkt wurde nach der für Tentagel<sup>®</sup> Rink Amid-Harze beschriebenen Methode vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 75.1$  ( $\epsilon_{260} = 159300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 471 nmol, 23.6%.

$\text{C}_{193}\text{H}_{246}\text{N}_{98}\text{O}_{56}$  ( $4834.64 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.29 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1612.4 (ber.: 1612.6),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 1209.5 (ber.: 1209.7),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 967.9 (ber.: 967.9),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 806.8 (ber.: 806.8),  $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ : 691.7 (ber.: 691.7),  $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ : 605.4 (ber.: 605.3).

### **IAc-ttccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (164)**

Die Synthese von **164** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.248 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **156**. Vor der Kupplung des ersten PNA-Thyminmonomers wurde 1  $\mu\text{mol}$  (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) abgenommen und für die Synthese von **165** zurückgelegt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 12.8$  ( $\epsilon_{260} = 65500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 195 nmol, 19.5%.

$\text{C}_{92}\text{H}_{120}\text{N}_{43}\text{O}_{29}\text{SI}$  ( $2451.18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.19 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1226.3 (ber.: 1226.6),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 818.0 (ber.: 818.1),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 613.9 (ber.: 613.8),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 491.3 (ber.: 491.2).

### **IAc-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (165)**

Die Synthese von **165** erfolgte an dem aus der Synthese von **164** zurückgelegten Harz (1  $\mu\text{mol}$ ) analog zu der von Verbindung **156**.

Ausbeute:  $OD_{260} = 4.7$  ( $\epsilon_{260} = 48600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 97 nmol, 9.7%.

$\text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{N}_{35}\text{O}_{21}\text{SI}$  ( $1918.67 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.84 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 960.1 (ber.: 960.3),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 640.6 (ber.: 640.6),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 480.8 (ber.: 480.7),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 384.8 (ber.: 384.7).

### **Ac-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (170)**

Die Synthese von **170** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.248 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **156**. Der N-Terminus wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift acetyliert.

Ausbeute:  $OD_{260} = 44.8$  ( $\epsilon_{260} = 48600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 922 nmol, 46.1%.

$\text{C}_{70}\text{H}_{93}\text{N}_{35}\text{O}_{21}\text{S}$  ( $1792.77 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.17 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 897.1 (ber.: 897.4),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 598.6 (ber.: 598.6),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 449.3 (ber.: 449.2),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 359.6 (ber.: 359.6).

### **BrAc-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (171)**

Die Synthese von **171** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.248 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **156**. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde Bromessigsäure verwendet.

Ausbeute:  $OD_{260} = 28.0$  ( $\epsilon_{260} = 48600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 576 nmol, 28.8%.

$\text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{N}_{35}\text{O}_{21}\text{SBr}$  ( $1871.67 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.84 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 963.8 (ber.: 936.8),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 625.0 (ber.: 624.9),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 469.1 (ber.: 468.9),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 375.5 (ber.: 375.3).

### **ClAc-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (172)**

Die Synthese von **172** erfolgte an 2  $\mu\text{mol}$  mit *S*-Trt-Mercaptopropionsäure funktionalisiertem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.248 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) analog zu der von Verbindung **156**. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde Chloressigsäure verwendet.

Ausbeute:  $OD_{260} = 39.9$  ( $\epsilon_{260} = 48600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 821 nmol, 41.1%.

$\text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{N}_{35}\text{O}_{21}\text{SCl}$  ( $1827.22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.80 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 913.9 (ber.: 914.6),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 609.8 (ber.: 610.1),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 457.9 (ber.: 457.8),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 366.5 (ber.: 366.5).

## **6.5.2 DNA-templatgesteuerte PNA-Verknüpfungs-Zyklisierungsreaktionen**

Alle Arbeiten wurden unter einem Strom von Argon durchgeführt. Es wurden entgaste und anschließend mit Argon gesättigte Puffer verwendet. Die Reaktionen wurden in 1.7 mL *SafeSeal microcentrifuge tubes (low binding polymer technology)* der Firma *Sorenson BioScience* angesetzt.

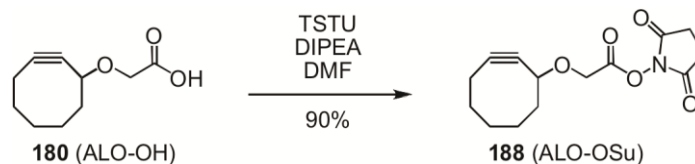
*Verfolgung der Verknüpfungsreaktionen mittels HPLC:* Der jeweilige PNA-Thioester und die bis-Thiol-PNA **158** wurden jeweils mit der doppelten Zielkonzentration (2  $\mu\text{M}$ ) einzeln in Puffer (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.0) gelöst. Bei Versuchen in Gegenwart des Reduktionsmittels TCEP wurde die doppelte Zielkonzentration aus einer gepufferten Stammlösung (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 7.0) zu der Lösung der bis-Thiol-PNA **158** gegeben und diese 10 min bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden gleiche Volumina beider Lösungen vereint und die Mischung auf verschiedene Reaktionsgefäße verteilt. Die angegebene Konzentration des DNA-Templats wurde zu den jeweiligen Lösungen hinzugegeben und diese in einem Thermoschüttler platziert. Bei Reaktionen mit Thermozyklisierung wurden zwei auf die jeweiligen Temperaturen vortemperierte Geräte verwendet. Nach den angegebenen Reaktionszeiten wurden Aliquote (100  $\mu\text{L}$ ) der Lösungen in HPLC-Gefäße überführt, welche 1  $\mu\text{L}$  TFA zum Stoppen der Reaktionen enthielten, und mittels analytischer HPLC untersucht. Die Ausbeuten wurden in jedem HPLC-Lauf als Verhältnis der Fläche unter dem Signal des jeweiligen Ligationsprodukts zu der Summe der Flächen unter den Signalen aller Reaktanden und Produkte, multipliziert mit 100, berechnet. Diese Vorgehensweise beruhte auf der Annahme, dass sich der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Produkts aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Reaktanden zusammensetzt. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden über die Steigungen von Regressionsgeraden im quasi-linearen Anfangsbereich der Reaktionen bestimmt.

### 6.5.3 Ermittlung der Templataffinitäten von linearen und zyklischen PNA-Konjugaten und Verknüpfungsprodukten

Die PNA-Konjugate **156**, **161**, **162** und **163** wurden in UV-Küvetten unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre jeweils mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in 1 mL entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Puffer (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.4) gelöst. Die Lösungen wurden 1 h bei Raumtemperatur equilibriert, um die quantitative Zyklisierung der chloracetylierten PNA **161** ( $\rightarrow$ **160**) sicherzustellen. Anschließend wurden 100  $\mu\text{M}$  TCEP aus einer gepufferten Stammlösung (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 7.4) sowie das DNA-Templat (1  $\mu\text{M}$ ) zugegeben und die Küvetten im UV/Vis-Spektrometer platziert. Die Denaturierungsexperimente wurden wie in Kapitel 6.2 beschrieben durchgeführt.

## 6.6 Versuche zu den PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen

### 6.6.1 Synthese des Cyclooct-1-in-3-glycolsäuresuccinimidylesters (**188**)



In 570  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF wurden 21 mg Cyclooct-1-in-3-glycolsäure **180**<sup>[282,283]</sup> (ALO-OH, 115  $\mu\text{mol}$ ) und 43 mg TSTU (143  $\mu\text{mol}$ ) gelöst. Dazu wurden 60  $\mu\text{L}$  DIPEA (344  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in einen Scheidetrichter mit 10 mL Essigsäureethylester gespült und 3 $\times$  mit je 5 mL 0.05 M HCl, 1 $\times$  mit 5 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2 $\times$  mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in wenig DCM/Methanol (9:1, v:v) aufgenommen und über Kieselgel filtriert. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde **188** als ein gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 29 mg (104  $\mu\text{mol}$ , 90%).

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_1\text{O}_5$  (279.29  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

DC:  $R_f = 0.60$  (DCM/Methanol/Ameisensäure 94:5:1, v:v:v).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 280.1$  (ber.: 280.3),  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 302.2$  (ber.: 302.3),  $[2\text{M}+\text{H}]^+ = 559.3$  (ber.: 559.6),  $[2\text{M}+\text{Na}]^+ = 581.3$  (ber.: 581.6).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.45\text{--}1.52$  und  $1.76\text{--}1.83$  (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ),  $1.58\text{--}1.69$  (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ),  $1.84\text{--}1.95$  (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ),  $2.01\text{--}2.16$  (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ),  $2.16\text{--}2.29$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{Cyclooctin})$ ), 2.84 (s, 4H, 2 $\times$   $\text{CH}_2(\text{Succinimid})$ ), 4.40–4.43 (m, 2H,  $\text{C}\equiv\text{C}\text{--CH}(\text{Cyclooctin})$ ), 4.40 (d,  $J = 17.1$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{COOR}$ ), 4.54 (d,  $J = 17.1$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{COOR}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 20.6$  ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{Cyclooctin})$ ), 25.5 (2 $\times$   $\text{CH}_2(\text{Succinimid})$ ), 26.0 ( $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ), 34.2 ( $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ), 42.1 ( $\text{CH}_2(\text{Cyclooctin})$ ), 63.8 ( $\text{CH}_2\text{COOR}$ ), 73.4 ( $\text{C}\equiv\text{C}\text{--CH}(\text{Cyclooctin})$ ), 90.7 ( $\text{C}\equiv\text{C}\text{--CH}(\text{Cyclooctin})$ ), 102.3 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{Cyclooctin})$ ), 165.8 ( $\text{COOR}$ ), 168.7 (2 $\times$   $\text{CON}(\text{Succinimid})$ ).



### 6.6.2 Synthese der PNA-Konjugate

#### BrAc-tcttccccac-Cys(H-Gly)-NH<sub>2</sub> (**187**)

Die Synthese von **187** wurde an  $2 \times 5 \mu\text{mol}$  mit Boc-Cys<sup>Fm</sup>-OH beladenem MBHA-Harz (Beladungsgrad:  $0.205 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) durchgeführt. Der Aufbau der PNA-Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur manuellen Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie. Nach der Kupplung des letzten PNA-Monomers wurden  $2 \mu\text{mol}$  (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) abgenommen und für die weitere Synthese verwendet. Zur Entfernung der Fm-Schutzgruppe am Thiol des Cysteins wurde das Harz erst gewaschen ( $5 \times$  entgastes und anschließend mit Argon gesättigtes DMF, je 1 mL) und dann  $2 \times 5 \text{ min}$  in einer entgasten und anschließend mit Argon gesättigten Lösung aus Piperidin/DBU/2-Mercaptoethanol/DMF (20:2:2:76, v:v:v:v, je 1 mL) geschüttelt. Danach wurde erneut gewaschen ( $10 \times$  entgastes und anschließend mit Argon gesättigtes DMF, je 1 mL) und  $4 \times 30 \text{ min}$  in einer Lösung aus 4 Äquiv. Cbz-Gly-OH (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 8 Äquiv. NMM in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem DMF geschüttelt. Zur Entfernung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe wurde das Harz gewaschen ( $5 \times$  DMF,  $10 \times$  DCM, je 1 mL),  $2 \times 1.5 \text{ min}$  in TFA/m-Kresol (19:1, v:v, je 1 mL) geschüttelt und erneut gewaschen ( $10 \times$  DCM,  $5 \times$  DMF, je 1 mL). Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde das Harz mit Bromessigsäure nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde nach Methode A vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 57.9$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 717 nmol, 35.9%.

$\text{C}_{111}\text{H}_{145}\text{N}_{52}\text{O}_{35}\text{SBr}$  ( $2879.64 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.06 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1440.5 (ber.: 1440.8),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 960.8 (ber.: 960.9),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 720.8 (ber.: 720.9),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 577.0 (ber.: 576.9),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 481.0 (ber.: 480.9).

#### BrAc-tcttccccac-Cys(ALO-Gly)-NH<sub>2</sub> (**181**)

$400 \text{ nmol}$  **187** wurden gefriergetrocknet, in  $300 \mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst und mit einer Lösung aus  $8.0 \mu\text{mol}$  ALO-OSu (**188**) in  $100 \mu\text{L}$  wasserfreiem DMF versetzt. Nach der Zugabe von  $0.5 \mu\text{L}$  DIPEA wurde das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde auf  $900 \mu\text{L}$  mit Wasser/Acetonitril/TFA (989:10:1, v:v:v) aufgefüllt und das Produkt mittels präparativer HPLC (Gradient 1) gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 7.8$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 97 nmol, 24.3%.

$\text{C}_{121}\text{H}_{157}\text{N}_{52}\text{O}_{37}\text{SBr}$  ( $3043.84 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.43 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 1115.6 (ber.: 1115.6),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 761.9 (ber.: 762.0),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 609.8 (ber.: 609.8),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 508.4 (ber.: 508.3).

### **H-Cys-cctacag-Lys( $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CO}$ )-NH<sub>2</sub> (182)**

Die Synthese von **182** wurde von Dr. Gerbrand van der Heden van Noort an mit Boc-Lys<sup>Fmoc</sup>-OH beladenem MBHA-Harz durchgeführt. Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur manuellen Festphasensynthese nach der Boc-Schutzgruppenstrategie unter Verwendung des geschützten Aminosäurebausteins Boc-Cys<sup>Trt</sup>-OH. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe von der Seitenkette des Lysins wurde das Harz  $2 \times 5 \text{ min}$  in Piperidin/DMF (1:4, v:v, je 1 mL) geschüttelt. Danach wurde das Harz gewaschen ( $10 \times$  DMF, je 1 mL) und  $3 \times 30 \text{ min}$  in einer Lösung aus 4 Äquiv. Azidoessigsäure (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes, Endkonzentration: ca. 0.1 M), 4 Äquiv. PyBOP und 8 Äquiv. NMM in DMF geschüttelt. Das Produkt wurde nach Methode B vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 25.4%.  $\varepsilon_{260} = 66300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

$\text{C}_{85}\text{H}_{113}\text{N}_{47}\text{O}_{23}\text{S}$  ( $2193.17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.82 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1097.4 (ber.: 1097.6),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 731.8 (ber.: 732.1),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 549.2 (ber.: 549.3),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 439.6 (ber.: 439.6).

### **Ac-tettccccac-Cys(H-Gly)-NH<sub>2</sub> (189)**

Die Synthese von **189** erfolgte an  $2 \mu\text{mol}$  des aus der Synthese von Verbindung **187** zurückgelegten Harzes. Der N-Terminus wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift acetyliert.

Ausbeute:  $OD_{260} = 64.2$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 795 nmol, 39.8%.

$\text{C}_{111}\text{H}_{146}\text{N}_{52}\text{O}_{35}\text{S}$  ( $2800.74 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.94 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1401.1 (ber.: 1401.4),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 934.4 (ber.: 934.6),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 701.0 (ber.: 701.2),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 561.1 (ber.: 561.2),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 467.8 (ber.: 467.8).

**Ac-tcttccccac-Cys(ALO-Gly)-NH<sub>2</sub> (190)**

Die Synthese von **190** erfolgte aus 400 nmol **189** und 8.0 µmol ALO-OSu (**188**) analog zu der von Verbindung **181**.

Ausbeute:  $OD_{260} = 15.3$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 189 nmol, 47.3%.

$\text{C}_{121}\text{H}_{158}\text{N}_{52}\text{O}_{37}\text{S}$  ( $2964.94 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.33 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 989.2 (ber.: 989.3),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 742.1 (ber.: 742.2),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 594.1 (ber.: 594.0),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 495.2 (ber.: 495.2).

**H-Cys-cctacag-Lys-NH<sub>2</sub> (191)**

Die Synthese von **191** wurde von Dr. Gerbrand van der Heden van Noort an mit Boc-Lys<sup>Fmoc</sup>-OH beladenem MBHA-Harz analog zu der von Verbindung **181** durchgeführt. Das Produkt wurde nach dem Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe von der Seitenkette des Lysins nach Methode B vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 20.3%.  $\epsilon_{260} = 66300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

$\text{C}_{83}\text{H}_{112}\text{N}_{44}\text{O}_{22}\text{S}$  ( $2110.12 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.67 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1055.5 (ber.: 1056.1),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 704.2 (ber.: 704.4),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 528.4 (ber.: 528.5),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 423.0 (ber.: 423.0).

**BrAc-tcttccccac-Cys(H-βAla)-NH<sub>2</sub> (193)**

Die Synthese von **193** erfolgte an 1 µmol des aus der Synthese von Verbindung **187** zurückgelegten Harzes. Zum Aufbau des Thioesters wurde der geschützte Aminosäurebaustein Cbz-βAla-OH verwendet.

Ausbeute:  $OD_{260} = 18.9$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 234 nmol, 23.4%.

$\text{C}_{112}\text{H}_{147}\text{N}_{52}\text{O}_{35}\text{SBr}$  ( $2893.66 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.14 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 965.5 (ber.: 965.6),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 724.4 (ber.: 724.4),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 579.7 (ber.: 579.7),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 483.4 (ber.: 483.3).

**ClAc-tcttccccac-Cys(H-Gly)-NH<sub>2</sub> (194)**

Die Synthese von **194** erfolgte an 1 µmol des aus der Synthese von Verbindung **187** zurückgelegten Harzes. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde Chloressigsäure verwendet.

Ausbeute:  $OD_{260} = 37.3$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 462 nmol, 46.2%.

$\text{C}_{111}\text{H}_{145}\text{N}_{52}\text{O}_{35}\text{SCl}$  ( $2835.18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.07 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 945.8 (ber.: 946.1),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 709.7 (ber.: 709.8),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 568.0 (ber.: 568.0),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 473.6 (ber.: 473.5).

**ClAc-tcttccccac-Cys(H-βAla)-NH<sub>2</sub> (195)**

Die Synthese von **195** erfolgte an 1 µmol des aus der Synthese von Verbindung **187** zurückgelegten Harzes. Zum Aufbau des Thioesters wurde der geschützte Aminosäurebaustein Cbz-βAla-OH verwendet. Die Halogenacetylierung des N-Terminus erfolgte mit Chloressigsäure.

Ausbeute:  $OD_{260} = 34.9$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 432 nmol, 43.2%.

$\text{C}_{112}\text{H}_{147}\text{N}_{52}\text{O}_{35}\text{SCl}$  ( $2849.21 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.09 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 950.5 (ber.: 950.7),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 713.2 (ber.: 713.3),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 570.8 (ber.: 570.8),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 475.9 (ber.: 475.9).

**Ac-tcttccccac-Cys(H-βAla)-NH<sub>2</sub> (196)**

Die Synthese von **196** erfolgte an 1 µmol des aus der Synthese von Verbindung **187** zurückgelegten Harzes. Zum Aufbau des Thioesters wurde der geschützte Aminosäurebaustein Cbz-βAla-OH verwendet. Der N-Terminus wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift acetyliert.

Ausbeute:  $OD_{260} = 37.0$  ( $\epsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 458 nmol, 45.8%.

$\text{C}_{112}\text{H}_{148}\text{N}_{52}\text{O}_{35}\text{S}$  ( $2814.77 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.03 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+2H]^{2+}$ : 1407.6 (ber.: 1408.4),  $[M+3H]^{3+}$ : 939.0 (ber.: 939.3),  $[M+4H]^{4+}$ : 704.6 (ber.: 704.7),  $[M+5H]^{5+}$ : 564.0 (ber.: 564.0).

#### **BrAc-tcttccccac-Cys(ALO- $\beta$ Ala)-NH<sub>2</sub> (197)**

Die Synthese von **197** erfolgte aus 220 nmol **193** und 4.4  $\mu$ mol ALO-OSu (**188**) analog zu der von Verbindung **181**.

Ausbeute:  $OD_{260} = 3.8$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 47 nmol, 21.4%.

$\text{C}_{122}\text{H}_{159}\text{N}_{52}\text{O}_{37}\text{SBr}$  ( $3057.86 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.52 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 1020.2 (ber.: 1020.3),  $[M+4H]^{4+}$ : 765.4 (ber.: 765.5),  $[M+5H]^{5+}$ : 612.5 (ber.: 612.6),  $[M+6H]^{6+}$ : 510.7 (ber.: 510.7).

#### **ClAc-tcttccccac-Cys(ALO-Gly)-NH<sub>2</sub> (198)**

Die Synthese von **198** erfolgte aus 450 nmol **194** und 9.0  $\mu$ mol ALO-OSu (**188**) analog zu der von Verbindung **181**.

Ausbeute:  $OD_{260} = 14.4$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 178 nmol, 39.9%.

$\text{C}_{121}\text{H}_{157}\text{N}_{52}\text{O}_{37}\text{SCl}$  ( $2999.39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.44 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+2H]^{2+}$ : 1500.5 (ber.: 1500.7),  $[M+3H]^{3+}$ : 1000.6 (ber.: 1000.8),  $[M+4H]^{4+}$ : 750.8 (ber.: 750.9),  $[M+5H]^{5+}$ : 600.8 (ber.: 600.9),  $[M+6H]^{6+}$ : 500.9 (ber.: 500.9).

#### **ClAc-tcttccccac-Cys(ALO- $\beta$ Ala)-NH<sub>2</sub> (199)**

Die Synthese von **199** erfolgte aus 420 nmol **194** und 8.4  $\mu$ mol ALO-OSu (**188**) analog zu der von Verbindung **181**.

Ausbeute:  $OD_{260} = 12.6$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 156 nmol, 37.2%.

$\text{C}_{122}\text{H}_{159}\text{N}_{52}\text{O}_{37}\text{SCl}$  ( $3013.41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.48 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+2H]^{2+}$ : 1507.6 (ber.: 1507.7),  $[M+3H]^{3+}$ : 1005.2 (ber.: 1005.5),  $[M+4H]^{4+}$ : 754.3 (ber.: 754.4),  $[M+5H]^{5+}$ : 603.7 (ber.: 603.7),  $[M+6H]^{6+}$ : 503.3 (ber.: 503.2).

**Ac-tcttccccac-Cys(ALO-βAla)-NH<sub>2</sub> (200)**

Die Synthese von **200** erfolgte aus 450 nmol **194** und 9.0 μmol ALO-OSu (**188**) analog zu der von Verbindung **181**.

Ausbeute:  $OD_{260} = 13.6$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 168 nmol, 37.4%.

$\text{C}_{122}\text{H}_{160}\text{N}_{52}\text{O}_{37}\text{S}$  ( $2978.97 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.52 \text{ min}$  (Gradient 13).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ : 1489.8 (ber.: 1490.5),  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 993.6 (ber.: 994.0),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 745.6 (ber.: 745.7),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 596.8 (ber.: 596.8).

**BrAc-tcttccccac-Cys-NH<sub>2</sub> (183)**

Die Synthese von **183** wurde an 5 μmol unbeladenem Tentagel<sup>®</sup> Rink Amid-Harz (Linker:  $0.180 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) durchgeführt. Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie. Es wurde der geschützte Aminosäurebaustein Fmoc-Cys<sup>Mmt</sup>-OH verwendet. Nach der Kupplung des letzten PNA-Monomers wurden 250 nmol (bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten Harzes) abgenommen und für die weitere Synthese verwendet. Zur Halogenacetylierung des N-Terminus wurde das Harz mit Bromessigsäure nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde nach der für Tentagel<sup>®</sup> Rink Amid-Harze beschriebenen Methode vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute:  $OD_{260} = 2.7$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 34 nmol, 13.4%.

$\text{C}_{109}\text{H}_{142}\text{N}_{51}\text{O}_{34}\text{SBr}$  ( $2822.58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 1.05 \text{ min}$  (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ : 941.8 (ber.: 941.9),  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ : 706.7 (ber.: 706.7),  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ : 565.6 (ber.: 565.5),  $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ : 471.5 (ber.: 471.4).

**Ac-tcttccccac-Cys-NH<sub>2</sub> (204)**

Die Synthese von **204** erfolgte an 250 nmol des aus der Synthese von Verbindung **183** zurückgelegten Harzes. Der N-Terminus wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Vorschrift acetyliert.

Ausbeute:  $OD_{260} = 2.6$  ( $\varepsilon_{260} = 80800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 32 nmol, 12.8%.

$\text{C}_{109}\text{H}_{143}\text{N}_{51}\text{O}_{34}\text{S}$  ( $2743.69 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

UPLC<sup>®</sup>:  $t_R = 0.92$  min (Gradient 12).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 915.4 (ber.: 915.6),  $[M+4H]^{4+}$ : 686.9 (ber.: 686.9),  $[M+5H]^{5+}$ : 549.8 (ber.: 549.7),  $[M+6H]^{6+}$ : 458.3 (ber.: 458.3).

### 6.6.3 DNA-templatgesteuerte PNA-Transfer-Zyklisierungsreaktionen

Alle Arbeiten wurden unter einem Strom von Argon durchgeführt. Es wurden entgaste und anschließend mit Argon gesättigte Puffer verwendet. Die Reaktionen wurden in 1.7 mL *SafeSeal microcentrifuge tubes (low binding polymer technology)* der Firma *Sorenson BioScience* angesetzt.

*Verfolgung der Verknüpfungsreaktionen mittels HPLC:* Der jeweilige PNA-Thioester und die jeweilige Cysteiny-PNA wurden jeweils mit der doppelten Zielkonzentration einzeln in Puffer (10 mM MOPS, 150 mM NaCl, pH 7.0) gelöst. Das Reduktionsmittel TCEP wurde in der doppelten Zielkonzentration (40  $\mu$ M) aus einer gepufferten Stammlösung (10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 7.0) zu der Lösung der jeweiligen Cysteiny-PNA gegeben und 10 min bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden gleiche Volumina beider Lösungen vereint und die Mischung auf verschiedene Reaktionsgefäße verteilt. Die angegebene Konzentration des DNA-Templats wurde zu den jeweiligen Lösungen hinzugegeben und diese in einem Thermoschüttler platziert. Nach den angegebenen Reaktionszeiten wurden Aliquote (100  $\mu$ L) der Lösungen in HPLC-Gefäße überführt, welche 1  $\mu$ L TFA zum Stoppen der Reaktionen enthielten, und mittels analytischer HPLC untersucht. Die Ausbeuten wurden in jedem HPLC-Lauf als Verhältnis der Fläche unter dem Signal des jeweiligen Produkts aus der Überträgersonde zu der Summe der Flächen unter den Signalen der Überträgersonde und ihres jeweiligen Produkts, multipliziert mit 100, berechnet. Diese Vorgehensweise beruhte auf der Annahme, dass sich der Extinktionskoeffizient während der Reaktion nicht ändert. Für die Versuche in Kapitel 4.4.3 wurde die Ausbeute in jedem HPLC-Lauf als Verhältnis der Fläche unter dem Signal des jeweiligen Produkts aus der Überträgersonde zu der Fläche unter dem Signal der entsprechenden Überträgersonde im HPLC-Lauf vor Zugabe des Templats (0 min), multipliziert mit 100, berechnet. Diese Vorgehensweise beruhte auf der zusätzlichen Annahme, dass die tatsächlich injizierte Stoffmenge in jedem Lauf identisch ist.

### 6.6.4 Ermittlung der Templataffinitäten von linearen und zyklischen Transferprodukten

Die PNA-Konjugate **183** und **205** wurden in UV-Küvetten unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre jeweils mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in 1 mL entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Puffer (10 mM MOPS, 150 mM NaCl, pH 7.0) gelöst. Die Lösungen wurden 1 h bei Raumtemperatur equilibriert, um die quantitative Zyklisierung der bromacetylierten PNA **183** ( $\rightarrow$ **185**) sicherzustellen. Anschließend wurden 20  $\mu\text{M}$  TCEP aus einer gepufferten Stammlösung (10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 7.0) sowie das jeweilige DNA-Templat (1  $\mu\text{M}$ ) zugegeben und die Küvetten im UV/Vis-Spektrometer platziert. Die Denaturierungsexperimente wurden wie in Kapitel 6.2 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich erfolgten Messungen des jeweiligen DNA-Templats ohne komplementäre PNA unter identischen Bedingungen.



## 7. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964–967.
- [3] I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 163–170.
- [4] M. J. Bessman, I. R. Lehman, E. S. Simms, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 171–177.
- [5] T. Inoue, L. E. Orgel, *Science* **1983**, *219*, 859–862.
- [6] A. W. Schwartz, L. E. Orgel, *Science* **1985**, *228*, 585–587.
- [7] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 932–935.
- [8] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, *327*, 346–347.
- [9] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197–9198.
- [10] S. M. Gryaznov, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3808–3809.
- [11] S. M. Gryaznov, R. Schultz, S. K. Chaturvedi, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2366–2369.
- [12] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177–186.
- [13] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350–1354.
- [14] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, *239*, 487–491.
- [15] M. Cargill, D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, et al., *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 231–238.
- [16] M. K. Halushka, J. B. Fan, K. Bentley, L. Hsie, N. Shen, A. Weder, R. Cooper, R. Lipshutz, A. Chakravarti, *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 239–247.
- [17] B. S. Shastri, *J. Hum. Genet.* **2002**, *47*, 561–566.
- [18] L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer, I. C. Wells, *Science* **1949**, *110*, 543–548.
- [19] V. M. Ingram, *Nature* **1957**, *180*, 326–328.
- [20] C. A. Marotta, B. G. Forget, M. Cohen-Solal, J. T. Wilson, S. M. Weissman, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5019–5031.
- [21] L. F. Soria, E. H. Ludwig, H. R. Clarke, G. L. Vega, S. M. Grundy, B. J. McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 587–591.

- 
- [22] E. D. Pleasance, R. K. Cheetham, P. J. Stephens, D. J. McBride, S. J. Humphray, C. D. Greenman, I. Varela, M.-L. Lin, G. R. Ordóñez, G. R. Bignell, et al., *Nature* **2010**, *463*, 191–196.
- [23] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris, *Science* **1991**, *253*, 49–53.
- [24] S. Bamford, E. Dawson, S. Forbes, J. Clements, R. Pettett, A. Dogan, A. Flanagan, J. Teague, P. A. Futreal, M. R. Stratton, et al., *Brit. J. Cancer* **2004**, *91*, 355–358.
- [25] E. De Clercq, F. Eckstein, T. C. Merigan, *Science* **1969**, *165*, 1137–1139.
- [26] H. P. Vosberg, F. Eckstein, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3633–3640.
- [27] F. Eckstein, G. Gish, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 97–100.
- [28] H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6131–6148.
- [29] H. Inoue, Y. Hayase, S. Iwai, E. Ohtsuka, *FEBS Lett.* **1987**, *215*, 327–330.
- [30] B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373–3386.
- [31] A. I. Lamond, B. S. Sproat, *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 123–127.
- [32] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- [33] S. K. Singh, P. Nielsen, A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 455–456.
- [34] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735–8738.
- [35] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401–5404.
- [36] G. Wang, E. Gunic, J.-L. Girardet, V. Stoisavljevic, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1147–1150.
- [37] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410–413.
- [38] D. A. Braasch, D. R. Corey, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1–7.
- [39] C. J. Leumann, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 841–854.
- [40] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [41] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895–1897.
- [42] M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677–9678.
- [43] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.

- 
- [44] M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 800–801.
- [45] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Nordén, *Nature* **1994**, 368, 561–563.
- [46] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Curr. Issues Mol. Biol.* **1999**, 1, 89–104.
- [47] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 1310–1313.
- [48] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2796–2823.
- [49] A. Ray, B. Nordén, *FASEB J.* **2000**, 14, 1041–1060.
- [50] S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science* **1994**, 265, 777–780.
- [51] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.
- [52] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 304–305.
- [53] R. B. Merrifield, *Science* **1986**, 232, 341–347.
- [54] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, F. Henrik, T. Koch, M. Egholm, E. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, et al., *J. Pept. Sci.* **1995**, 3, 175–183.
- [55] G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1939–1942.
- [56] S. Sforza, G. Haaima, R. Marchelli, P. E. Nielsen, *European J. Org. Chem.* **1999**, 197–204.
- [57] S. Sforza, R. Corradini, S. Ghirardi, A. Dossena, R. Marchelli, *European J. Org. Chem.* **2000**, 2905–2913.
- [58] V. Menchise, G. De Simone, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, R. Marchelli, D. Capasso, M. Saviano, C. Pedone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 12021–12026.
- [59] T. Tedeschi, S. Sforza, R. Corradini, R. Marchelli, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 8395–8399.
- [60] A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, B. M. Frezza, C. Gayathri, R. R. Gil, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10258–10267.
- [61] J. I. Yeh, B. Shivachev, S. Rapireddy, M. J. Crawford, R. R. Gil, S. Du, M. Madrid, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10717–10727.
- [62] P. Zhou, M. Wang, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6878–6879.
- [63] E. A. Englund, D. H. Appella, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3465–3467.

- [64] E. A. Englund, D. H. Appella, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1414–1418.
- [65] C. Dose, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 65–77.
- [66] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e103.
- [67] P. Kainz, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1494*, 23–27.
- [68] H. Li, U. B. Gyllenstein, X. Cui, R. K. Saiki, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Nature* **1988**, *335*, 414–417.
- [69] A. J. Jeffreys, V. Wilson, R. Neumann, J. Keyte, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 10953–10971.
- [70] G. Ruano, K. K. Kidd, J. C. Stephens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 6296–6300.
- [71] C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. A. Moss, R. P. Rasmussen, *Biotechniques* **1997**, *22*, 130–138.
- [72] C. T. Wittwer, K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A. David, R. A. Gundry, U. J. Balis, *Biotechniques* **1997**, *22*, 176–181.
- [73] R. S. Tuma, M. P. Beaudet, X. Jin, L. J. Jones, C.-Y. Cheung, S. Yue, V. L. Singer, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 278–288.
- [74] R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, R. Griffith, *Biotechnology* **1992**, *10*.
- [75] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, *Biotechnology* **1993**, *11*, 1026–1030.
- [76] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [77] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49–53.
- [78] S. A. E. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Genet. Anal.* **1999**, *14*, 151–156.
- [79] D. P. Bratu, B.-J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13308–13313.
- [80] A. Okamoto, K. Tanabe, T. Inasaki, I. Saito, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2502–2504.
- [81] R. A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, D. E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 8790–8794.
- [82] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.
- [83] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7–17.
- [84] P. S. Bernard, R. S. Ajioka, J. P. Kushner, C. T. Wittwer, *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 1055–1061.
- [85] P. S. Bernard, G. H. Pritham, C. T. Wittwer, *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 221–228.
- [86] K. S. Elenitoba-Johnson, S. D. Bohling, C. T. Wittwer, T. C. King, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 249–253.

- [87] A. Millson, A. Suli, L. Hartung, S. Kunitake, A. Bennett, M. C. L. Nordberg, W. Hanna, C. T. Wittwer, A. Seth, E. Lyon, *J. Mol. Diagn.* **2003**, 5, 184–190.
- [88] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2203–2206.
- [89] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938–2939.
- [90] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69–77.
- [91] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, 375, 318–330.
- [92] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2439–2448.
- [93] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1931–1934.
- [94] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 2051–2060.
- [95] A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, D. Williams, N. Al-Obaidi, F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, O. Seitz, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 2152–2167.
- [96] F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, 13, 2072–2081.
- [97] F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 19025–19032.
- [98] V. Karunakaran, J. L. Pérez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2954–2962.
- [99] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 7276–7280.
- [100] L. G. Lee, C. R. Connell, W. Bloch, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 3761–3766.
- [101] K. J. Livak, S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, *Genome Res.* **1995**, 4, 357–362.
- [102] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, *Genome Res.* **1996**, 6, 986–994.
- [103] U. E. Gibson, C. A. Heid, P. M. Williams, *Genome Res.* **1996**, 6, 995–1001.
- [104] K. J. Livak, *Genet. Anal.* **1999**, 14, 143–149.
- [105] D. Whitcombe, J. Theaker, S. P. Guy, T. Brown, S. Little, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 804–807.
- [106] N. Thelwell, S. Millington, A. Solinas, J. Booth, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 3752–3761.
- [107] U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* **1988**, 241, 1077–1080.
- [108] J. Luo, D. E. Bergstrom, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3071–3078.

- [109] D. A. Nickerson, R. Kaiser, S. Lappin, J. Stewart, L. Hood, U. Landegren, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 8923–8927.
- [110] V. O. Tobe, S. L. Taylor, D. A. Nickerson, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3728–3732.
- [111] C. B. Rothschild, C. S. Brewer, B. Loggie, G. A. Beard, M. X. Triscott, *J. Immunol. Methods* **1997**, *206*, 11–19.
- [112] H. Baron, S. Fung, A. Aydin, S. Bähring, F. C. Luft, H. Schuster, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1279–1282.
- [113] X. Chen, K. J. Livak, P.-Y. Kwok, *Genome Res.* **1998**, *8*, 549–556.
- [114] X. Chen, P.-Y. Kwok, *Genet. Anal.* **1999**, *14*, 157–163.
- [115] A. Kausar, R. D. McKay, J. Lam, R. S. Bhogal, A. Y. Tang, J. M. Gibbs-Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8922–8926.
- [116] A. Kausar, C. J. Mitran, Y. Li, J. M. Gibbs-Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10577–10581.
- [117] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870.
- [118] T. N. Grossmann, A. Strohbach, O. Seitz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2185–2192.
- [119] J. Michaelis, A. Roloff, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 2821–2833.
- [120] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722–2728.
- [121] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 317–322.
- [122] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5496–5501.
- [123] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7963–7969.
- [124] C. Böhrer, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578–581.
- [125] J. G. Schmidt, L. Christensen, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4792–4796.
- [126] M. Koppitz, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4563–4569.
- [127] E. Kervio, A. Hochgesand, U. E. Steiner, C. Richert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 12074–12079.
- [128] A. Kaiser, S. Spies, T. Lommel, C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8299–8303.
- [129] K. Leu, E. Kervio, B. Obermayer, R. M. Turk-MacLeod, C. Yuan, J.-M. Luevano, E. Chen, U. Gerland, C. Richert, I. A. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 354–366.
- [130] G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 1235–1237.
- [131] G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, M. Matzen, S. Jordan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 423–426.

- [132] D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Nature* **1994**, 369, 221–224.
- [133] D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Chem.-Eur. J.* **1998**, 4, 629–641.
- [134] A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245–248.
- [135] L. E. Orgel, *Nature* **1992**, 358, 203–209.
- [136] N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, O. I. Gryaznova, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 3721–3738.
- [137] N. I. Sokolova, D. T. Ashirbekova, N. G. Dolinnaya, Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **1988**, 232, 153–155.
- [138] M. K. Herrlein, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5076–5078.
- [139] R. J. Lewis, P. C. Hanawalt, *Nature* **1982**, 298, 393–396.
- [140] R. L. Letsinger, T. Wu, R. Elghanian, *Nucleosides and Nucleotides* **1997**, 16, 643–652.
- [141] J. Liu, J.-S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3300–3304.
- [142] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5646–5647.
- [143] S. Ogasawara, K. Fujimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4512–4515.
- [144] Y. Yoshimura, D. Okamura, M. Ogino, K. Fujimoto, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5049–5051.
- [145] T. Ihara, T. Fujii, M. Mukae, Y. Kitamura, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8880–8881.
- [146] M. Mukae, T. Ihara, M. Tabara, A. Jyo, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1349–1354.
- [147] Y. Gat, D. G. Lynn, *Biopolymers* **1998**, 48, 19–28.
- [148] Z.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12420–12421.
- [149] P. Luo, J. C. Leitzel, Z.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3019–3031.
- [150] D. Albagli, R. Van Atta, P. Cheng, B. Huan, M. L. Wood, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6954–6955.
- [151] Y. Xu, E. T. Kool, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5595–5598.
- [152] Y. Xu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 875–881.
- [153] D. Y. Wu, R. B. Wallace, *Gene* **1989**, 76, 245–254.
- [154] Y. Xu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3159–3164.
- [155] Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 148–152.
- [156] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2096–2097.
- [157] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9686–9687.
- [158] S. Sando, H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1081–1087.
- [159] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 4978–4986.

- [160] A. P. Silverman, E. J. Baron, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1890–1894.
- [161] H. Abe, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 263–268.
- [162] D. J. Kleinbaum, G. P. Miller, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1115–1120.
- [163] D. J. Kleinbaum, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8154–8156.
- [164] H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13980–13986.
- [165] A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3178–3181.
- [166] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129–149.
- [167] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [168] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640–6646.
- [169] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 49–56.
- [170] A. Mattes, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2001**, 2050–2051.
- [171] S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2098–2103.
- [172] J. Tong, W. Cao, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 788–794.
- [173] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9970–9981.
- [174] S. Ficht, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2005**.
- [175] C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5369–5373.
- [176] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030–10074.
- [177] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974–6998.
- [178] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1589–1600.
- [179] Y.-X. Chen, G. Triola, H. Waldmann, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 762–773.
- [180] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5131–5142.
- [181] E. Jentzsch, A. Mokhir, *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 9593–9595.
- [182] H. Sun, X. Peng, *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24, 1226–1234.
- [183] J. Seckute, J. Yang, N. K. Devaraj, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, e148.
- [184] Y. Huang, J. M. Coull, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3238–3239.
- [185] K. Meguellati, G. Koripelly, S. Ladame, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2738–2742.
- [186] G. Koripelly, K. Meguellati, S. Ladame, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2103–2109.
- [187] D. K. Prusty, A. Herrmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12197–12199.
- [188] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15596–15597.
- [189] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem.-Eur. J.* **2009**, 15, 6723–6730.
- [190] T. N. Grossmann, L. Röglin, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7119–7122.



- 
- [191] T. N. Grossmann, S. Sasaki, M. Ritzefeld, S. W. Choi, A. Maruyama, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 34–39.
- [192] J. Michaelis, A. Maruyama, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 618–620.
- [193] X.-H. Chen, A. Roloff, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4479–4483.
- [194] A. Shibata, T. Uzawa, Y. Nakashima, M. Ito, Y. Nakano, S. Shuto, Y. Ito, H. Abe, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14172–14178.
- [195] A. Shibata, H. Abe, M. Ito, Y. Kondo, S. Shimizu, K. Aikawa, Y. Ito, *Chem. Commun.* **2009**, 6586–6588.
- [196] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2828–2832.
- [197] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4993–4997.
- [198] L. Yang, Z. Cao, H. Yan, W. C. Wood, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6815–6824.
- [199] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [200] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [201] J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324–16325.
- [202] Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822.
- [203] H. Abe, J. Wang, K. Furukawa, K. Oki, M. Uda, S. Tsuneda, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1219–1226.
- [204] K. Furukawa, H. Abe, J. Wang, M. Uda, H. Koshino, S. Tsuneda, Y. Ito, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 671–677.
- [205] R. M. Franzini, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2981–2988.
- [206] K. Furukawa, H. Abe, K. Hibino, Y. Sako, S. Tsuneda, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1026–1036.
- [207] Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492–6497.
- [208] K. Gorska, I. Keklikoglou, U. Tschulena, N. Winssinger, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1969–1975.
- [209] H. Saneyoshi, Y. Ito, H. Abe, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13632–13635.
- [210] M. Röthlingshöfer, K. Gorska, N. Winssinger, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 482–485.
- [211] K. K. Sadhu, N. Winssinger, *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19*, 8182–8189.
- [212] K. Gorska, A. Manicardi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4364–4366.
- [213] R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16021–16023.
- [214] R. M. Franzini, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1869–1877.
- [215] R. M. Franzini, E. T. Kool, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 2168–2175.

- [216] H. Li, R. M. Franzini, C. Bruner, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2132–2137.
- [217] E. M. Harcourt, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e65.
- [218] M. Nilsson, H. Malmgren, M. Samiotaki, M. Kwiatkowski, B. P. Chowdhary, U. Landegren, *Science* **1994**, *265*, 2085–2088.
- [219] Z. Ma, J.-S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11159–11163.
- [220] Z. Ma, J.-S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2501–2510.
- [221] Z. Ma, J.-S. Taylor, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 679–683.
- [222] J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751–754.
- [223] N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4013–4015.
- [224] E. Cló, J. W. Snyder, N. V. Voigt, P. R. Ogilby, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4200–4201.
- [225] D. Arian, E. Cló, K. V. Gothelf, A. Mokhir, *Chem.-Eur. J.* **2010**, *16*, 288–295.
- [226] S. Dutta, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1243–1245.
- [227] S. Dutta, B. Flottmann, M. Heilemann, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9664–9666.
- [228] S. Dutta, A. Fülöp, A. Mokhir, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1533–1542.
- [229] D. K. Prusty, M. Kwak, J. Wildeman, A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11894–11898.
- [230] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682–4689.
- [231] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [232] I. A. Prior, P. D. Lewis, C. Mattos, *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2457–2467.
- [233] H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, et al., *Nature* **2002**, *417*, 949–954.
- [234] P. M. Pollock, U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, T. Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, et al., *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 19–20.
- [235] K. E. Mercer, C. A. Pritchard, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1653*, 25–40.
- [236] R. Kumar, S. Angelini, K. Czene, I. Sauroja, M. Hahka-Kemppinen, S. Pyrhönen, K. Hemminki, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 3362–3368.
- [237] H. Gear, H. Williams, E. G. Kemp, F. Roberts, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45*, 2484–2488.
- [238] N. Goldenberg-Cohen, Y. Cohen, E. Rosenbaum, Z. Herscovici, I. Chowers, D. Weinberger, J. Pe'er, D. Sidransky, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 3027–3030.
- [239] J. S. Goydos, B. Mann, H. J. Kim, E. M. Gabriel, J. Alsina, F. J. Germino, W. Shih, D. H. Gorski, *J. Am. Coll. Surg.* **2005**, *200*, 362–370.

- [240] C. S. Janssen, R. Sibbett, F. L. Henriquez, I. C. McKay, E. G. Kemp, F. Roberts, *Brit. J. Cancer* **2008**, *99*, 1673–1677.
- [241] M. Xing, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 1365–1368.
- [242] M. Xing, W. H. Westra, R. P. Tufano, Y. Cohen, E. Rosenbaum, K. J. Rhoden, K. A. Carson, V. Vasko, A. Larin, G. Tallini, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 6373–6379.
- [243] A. Roloff, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2008**.
- [244] T. N. Grossmann, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2008**.
- [245] Y. Yin, X. S. Zhao, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1172–1181.
- [246] C. Dose, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2006**.
- [247] J. Brownie, S. Shawcross, J. Theaker, D. Whitcombe, R. Ferrie, C. Newton, S. Little, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3235–3241.
- [248] U. B. Gyllensten, H. A. Erlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 7652–7656.
- [249] S. K. Poddar, *Mol. Cell. Probes* **2000**, *14*, 25–32.
- [250] J. Kovács, T. Rödlér, A. Mokhir, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7815–7817.
- [251] J. Kovács, E. Jentsch, A. Mokhir, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 11965–11971.
- [252] H. Abe, Y. Kondo, H. Jinmei, N. Abe, K. Furukawa, A. Uchiyama, S. Tsuneda, K. Aikawa, I. Matsumoto, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 327–333.
- [253] L. Moggio, L. De Napoli, B. Di Blasio, G. Di Fabio, J. D’Onofrio, D. Montesarchio, A. Messere, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2015–2018.
- [254] D. Bang, B. L. Pentelute, Z. P. Gates, S. B. Kent, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1049–1052.
- [255] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- [256] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [257] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793–16797.
- [258] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [259] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272.
- [260] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [261] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.

- 
- [262] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805–815.
- [263] R. van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 392–398.
- [264] M. Bodansky, M. A. Bednarek, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 434–437.
- [265] M. Ruiz-Gayo, F. Albericio, E. Pedroso, E. Giralt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1501–1502.
- [266] P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 344–347.
- [267] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775–3789.
- [268] R. E. Kleiner, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5707–5717.
- [269] A. Shibata, H. Abe, Y. Ito, *Molecules* **2012**, *17*, 2446–2463.
- [270] K. Gorska, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6820–6843.
- [271] C. Percivalle, J.-F. Bartolo, S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 16–26.
- [272] O. Vázquez, O. Seitz, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 78–86.
- [273] A. Roloff, S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1050*, 131–141.
- [274] A. Roloff, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 432–436.
- [275] A. Roloff, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3458–3464.
- [276] A. Roloff, O. Seitz, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2322–2328.
- [277] Y. Brudno, M. E. Birnbaum, R. E. Kleiner, D. R. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 148–155.
- [278] A. Roloff, O. Seitz, *Artif. DNA. PNA XNA* **2010**, *1*, 61–63.
- [279] A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498–1500.
- [280] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878–3881.
- [281] C. Dose, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 59–65.
- [282] A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé, I. Texier, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583–588.
- [283] C. Ornelas, R. Lodescar, A. Durandin, J. W. Canary, R. Pennell, L. F. Liebes, M. Weck, *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 3619–3629.
- [284] A. V Tataurov, Y. You, R. Owczarzy, *Biophys. Chem.* **2008**, *133*, 66–70.
- [285] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, S. G. Rozen, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115.

- [286] P. Blaney, R. Grigg, Z. Rankovic, M. Thornton-Pett, J. Xu, *Tetrahedron* **2002**, 58, 1719–1737.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Die Nukleobasen in DNA-Oligomeren wurden durch Großbuchstaben und die in PNA-Oligomeren durch Kleinbuchstaben abgekürzt. Aminosäuren wurden im Dreibuchstabencode abgekürzt. Alle PNA-Konjugate wurden von links nach rechts vom N- zum C-Terminus dargestellt.

Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Alloc	Allyloxycarbonyl
ALO	Cycloct-1-in-3-glycolsäure
APT	<i>attached proton test</i>
Äquiv.	Äquivalent/e
a. u.	<i>arbitrary units</i>
ber.	berechnet
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
BIR	<i>baculoviral IAP repeat</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
Bu	Butyl
ca.	<i>circa</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Dabcyl	4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoyl
Dabsyl	4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzosulfonyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMB	<i>N,N'</i> -Dimethylbarbitursäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DOL	<i>dye-labeled oligonucleotide ligation</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	enzymgekoppelter Immunosorbent <i>assay</i>
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
<i>F</i>	Fluoreszenz
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fm	9-Fluorenylmethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ggf.	gegebenenfalls
Grb-2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorbenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HI-Virus	humanes Immundefizienz-Virus
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
HR-FTMS	hochauflösende Fourier-Transform-MS
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
<i>i</i> Cys	Isocystein
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
<i>m</i>	<i>meta</i>
MALDI/TOF	matrixunterstützte Laserdesorption und -Ionisation / Flugzeitdetektion
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
Me	Methyl
MESNa	Natrium-2-mercaptoethansulfonat
MESNA	2-Mercaptoethansulfonsäure
miRNA	microRNA
Mmt	4-Monomethoxytrityl

## 8. Abkürzungsverzeichnis

---

MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MPAA	4-Mercaptophenylelessigsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
NCL	<i>native chemical ligation</i>
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	kernmagnetische Resonanz
<i>OD</i>	optische Dichte
OLA	<i>oligonucleotide ligation assay</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNA	Peptidnukleinsäure
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Q-STAR	<i>quenched Staudinger-triggered <math>\alpha</math>-azido-ether release</i>
QUAL	<i>quenched autoligation</i>
quat.	quaternär
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
$R_f$	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
<i>S</i>	Einzelbasenspezifität
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SPAAC	ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Su	Succinimidyl
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure



---

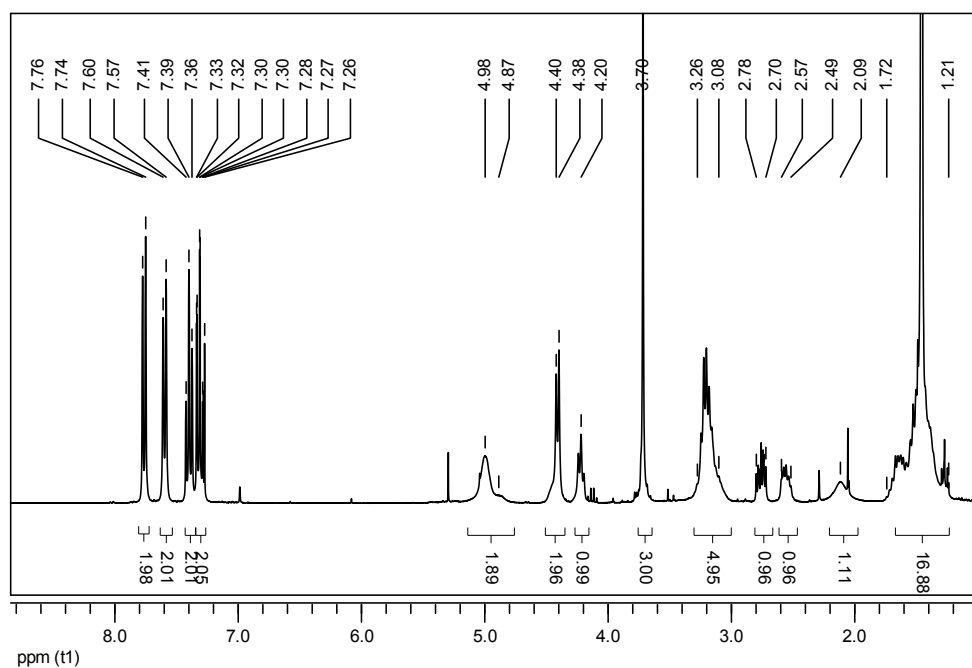
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
th.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
$T_M$	Schmelztemperatur
TMR	6-Carboxytetramethylrhodamin
TPP	Triphenylphosphin
$t_R$	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -( <i>N</i> -succinimidyl)uroniumtetrafluoroborat
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigchromatografie
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vis	sichtbar
XIAP	<i>X-linked LAP</i>
$\lambda_{ex.}$	Anregungswellenlänge
$\lambda_{em.}$	Emissionswellenlänge

## 9. Anhang

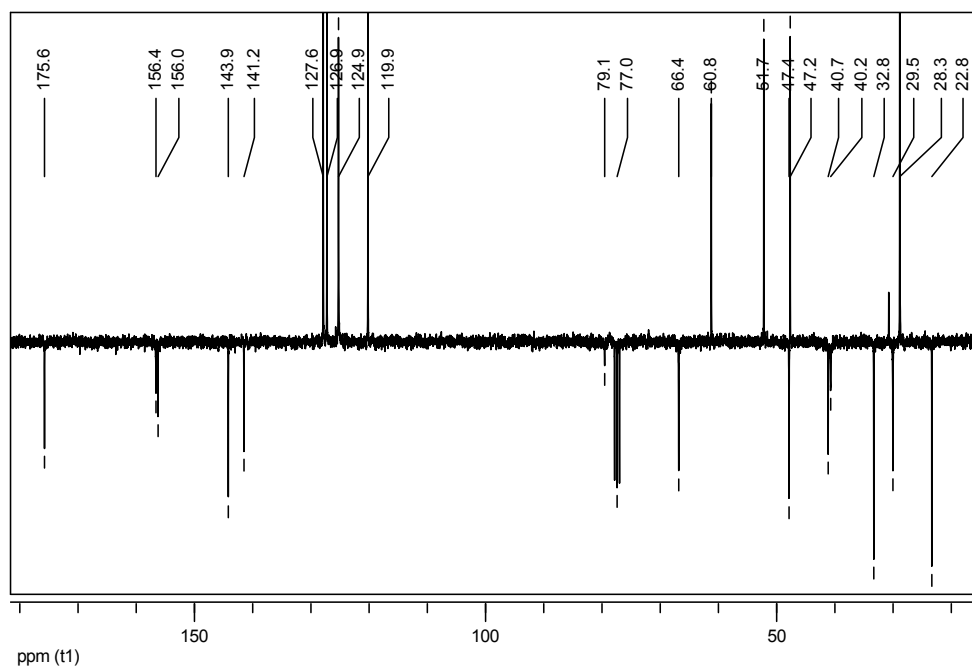
### 9.1 NMR-Spektren

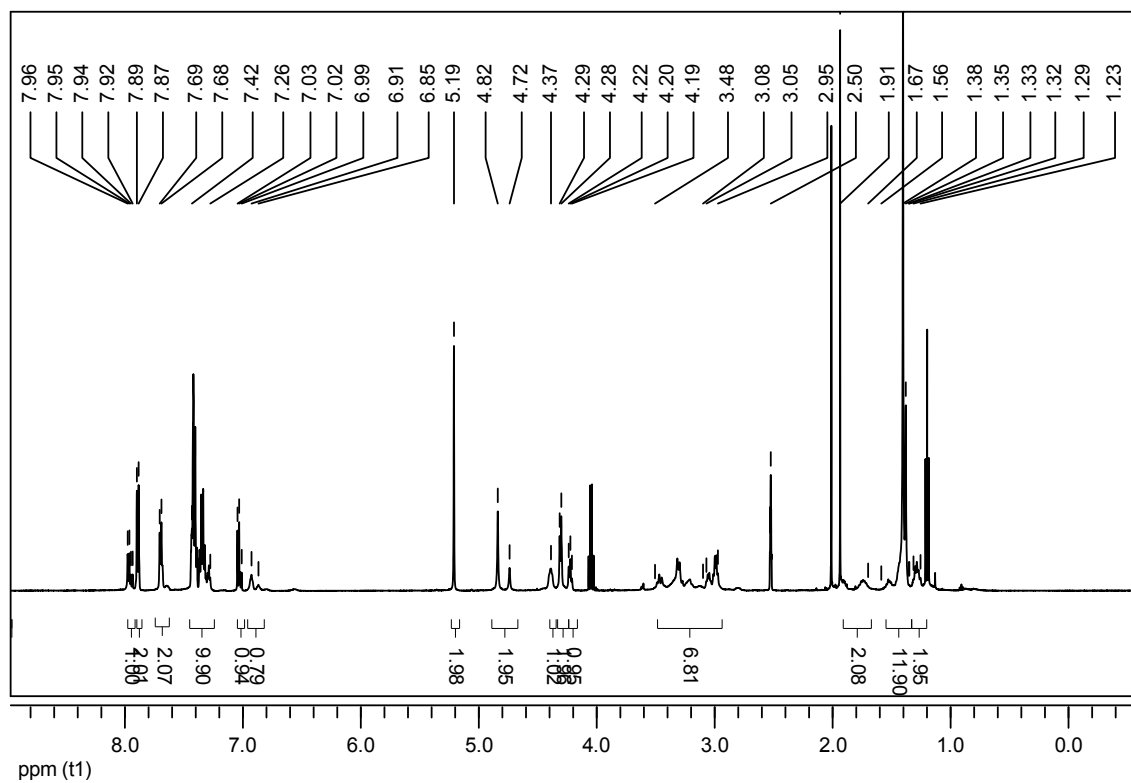
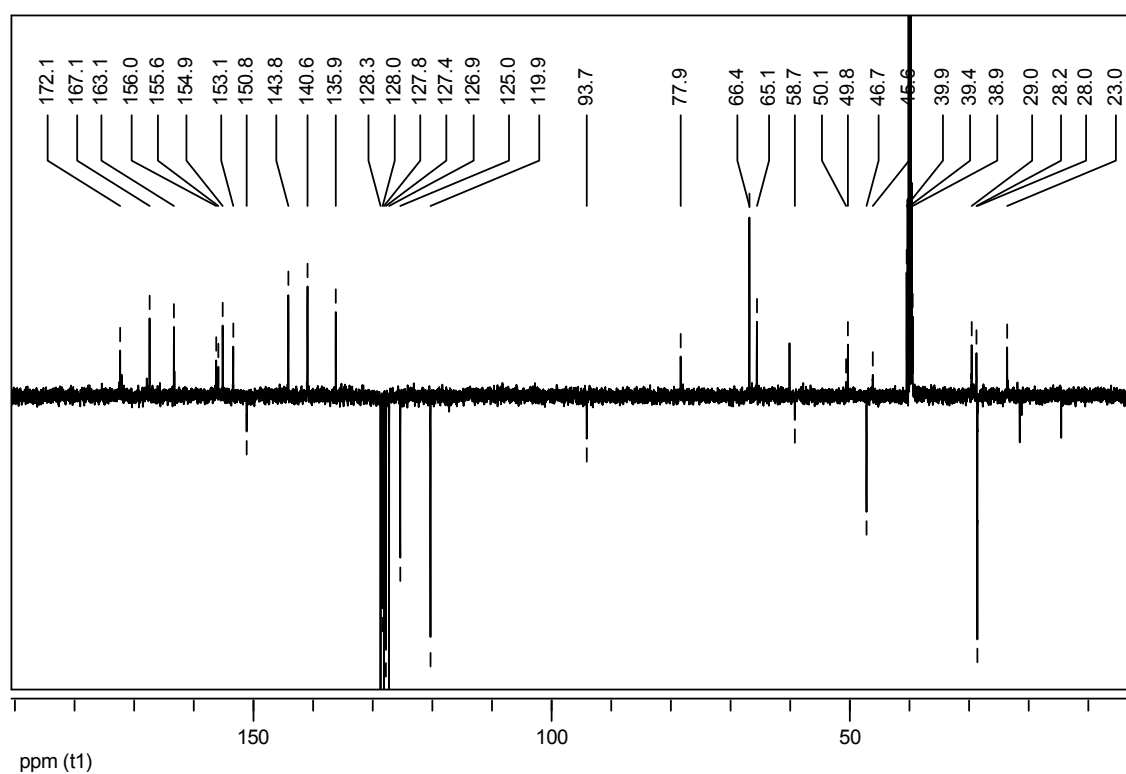
#### Modifiziertes PNA-Rückgrat (107)

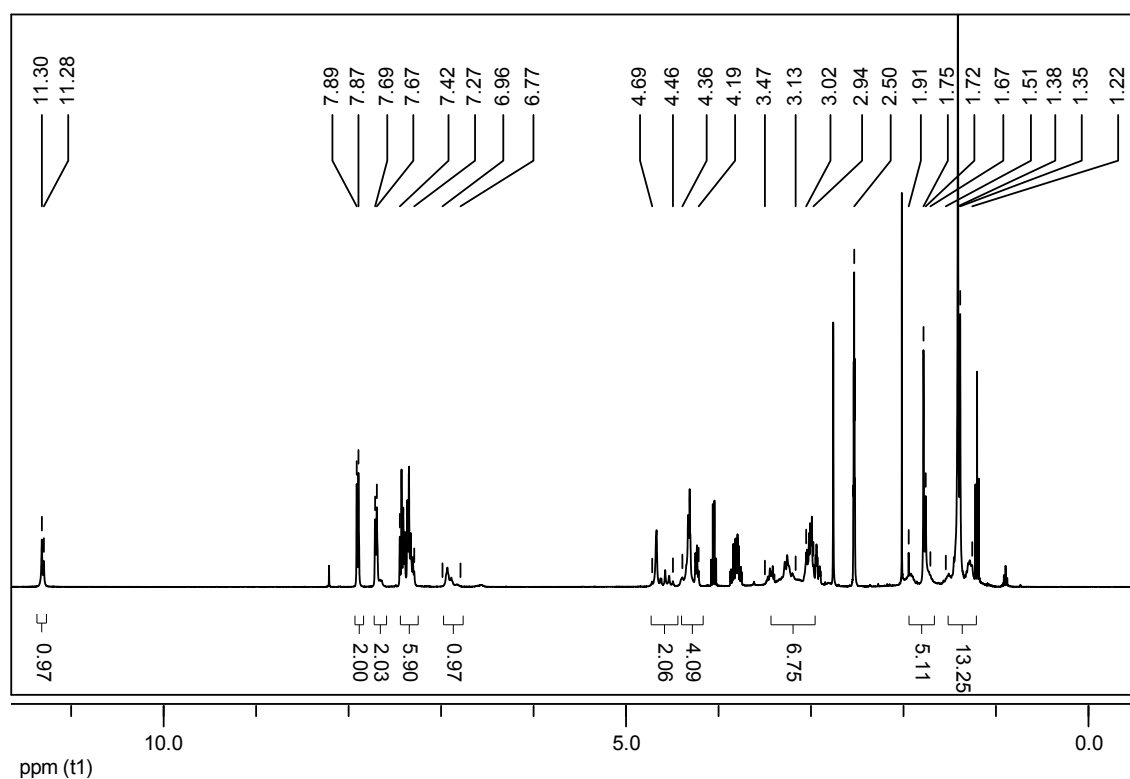
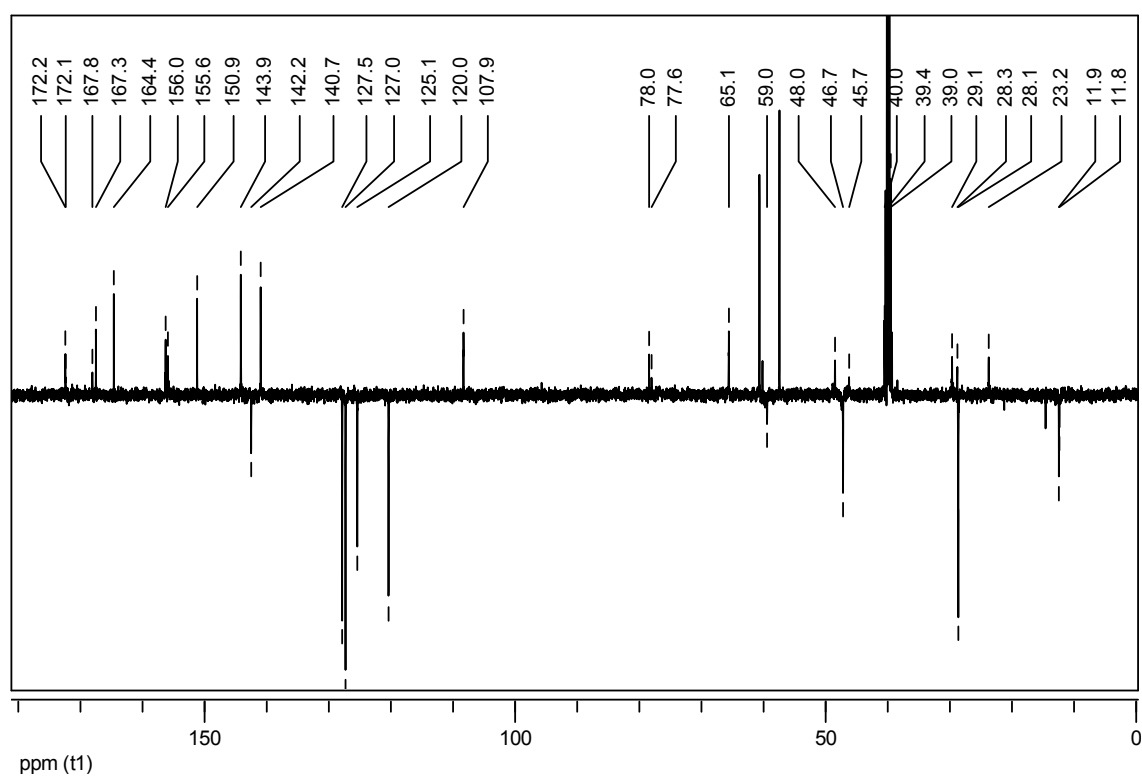
$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

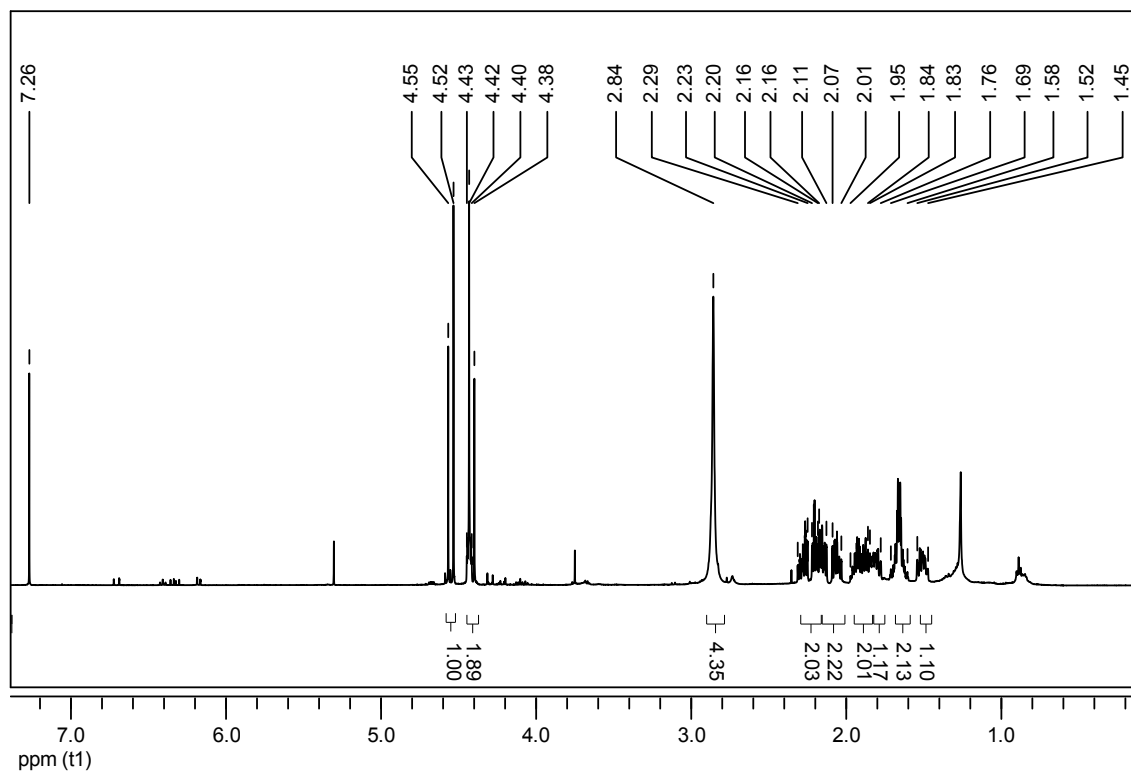
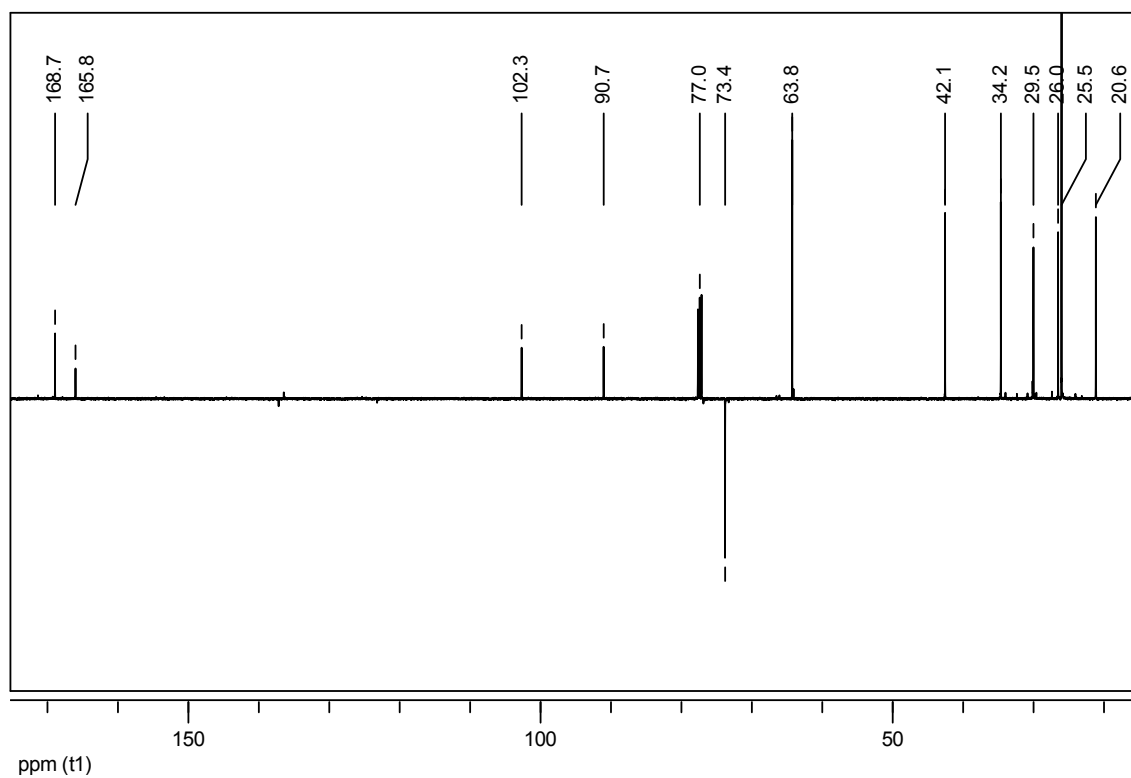


$^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):



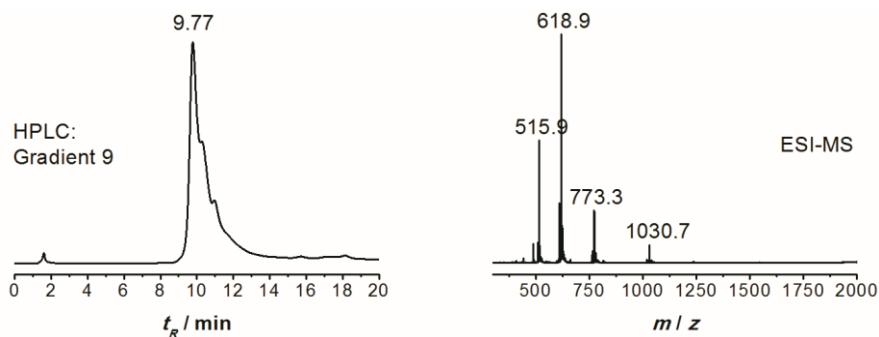
**Modifiziertes PNA-Cytosinmonomer (110)** $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): $^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 125 MHz, DMSO- $d_6$ ):

**Modifiziertes PNA-Thyminmonomer (111)** $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): $^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 100 MHz, DMSO- $d_6$ ):

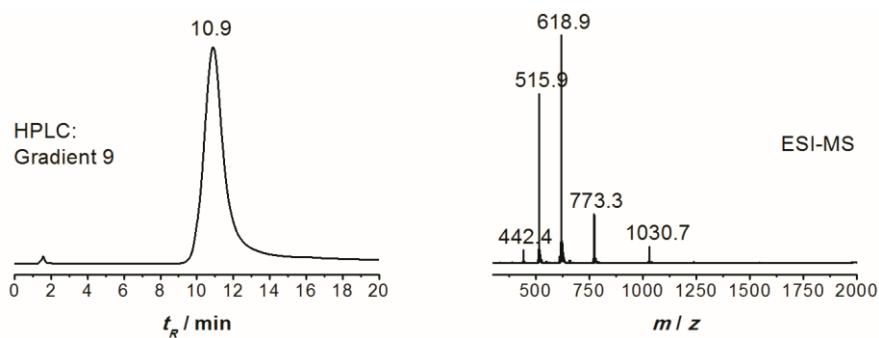
**Cyclooct-1-in-3-glycolsäuresuccinimidylester (188)** $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): $^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

## 9.2 Chromatogramme und Massenspektren von PNA-Konjugaten

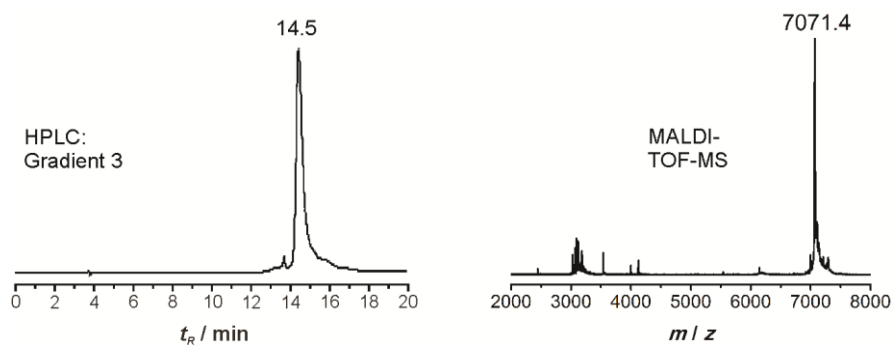
### H-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (115)



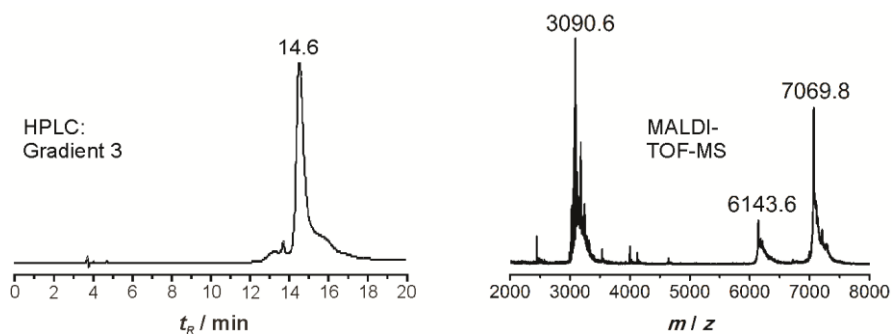
### H-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (116)



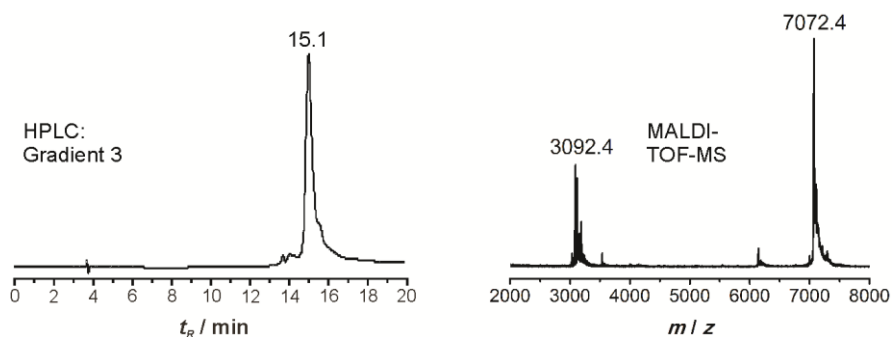
### Ac-gcactcttgc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)cca-βAla-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (117)



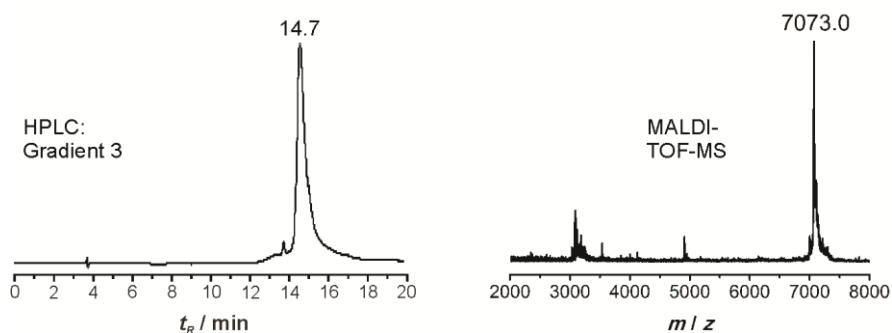
**Ac-gcactctt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gccca-βAla-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (118)**



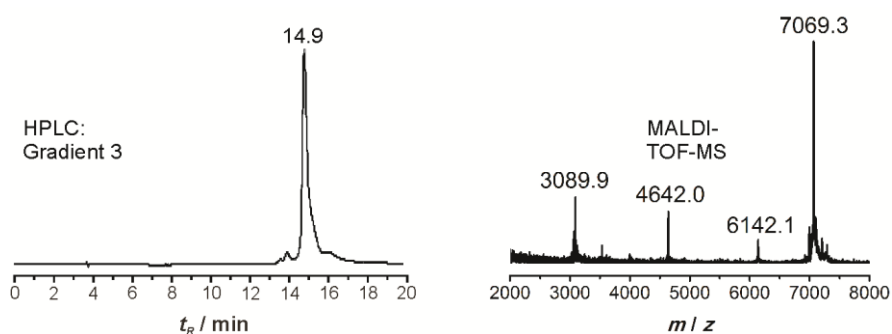
**Ac-gcactcttgc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)cca-βAla-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (119)**

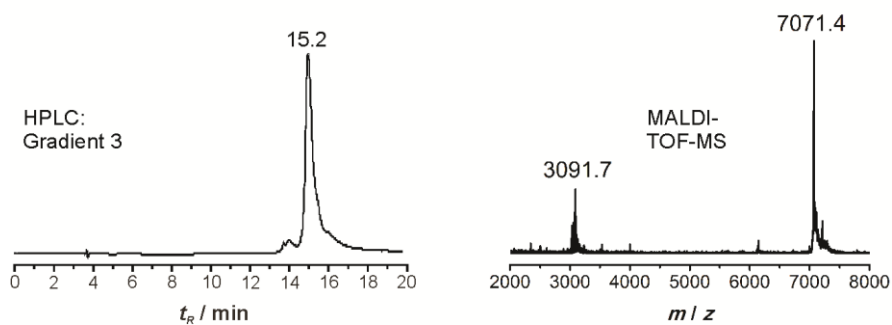
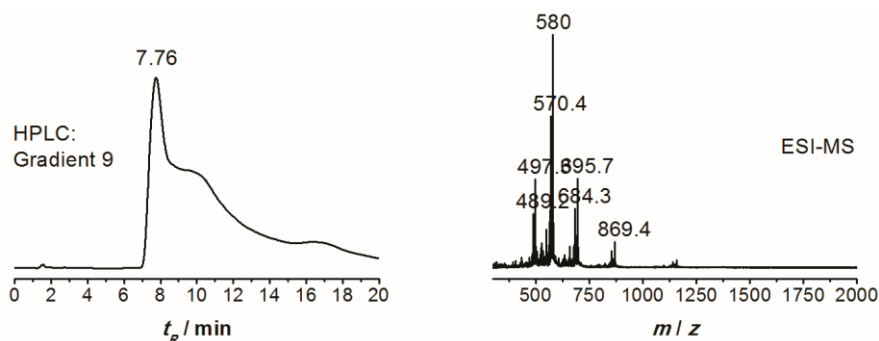
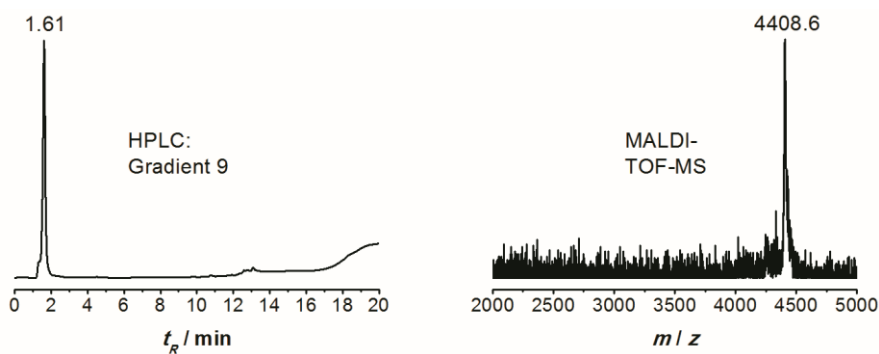
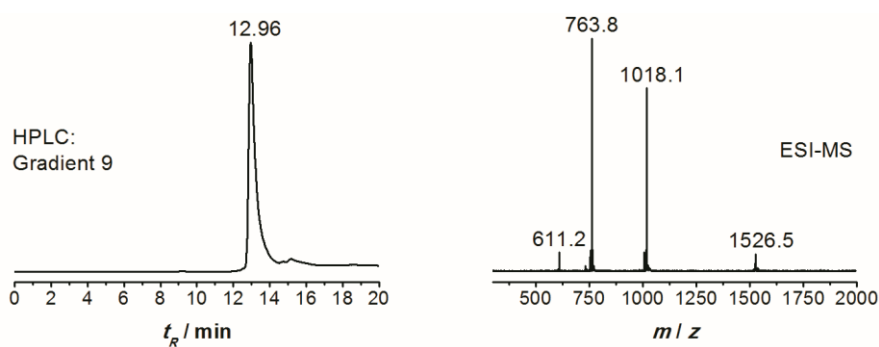


**Ac-gcactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)ttgccca-βAla-*i*Cys-acc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gacggc-Gly-NH<sub>2</sub> (120)**



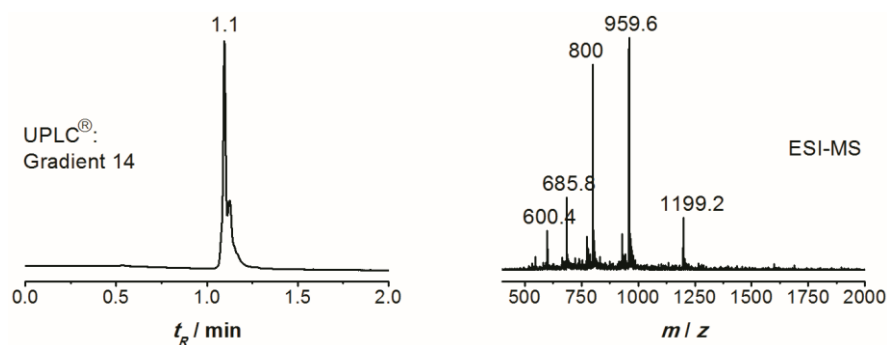
**Ac-gcactctt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gccca-βAla-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (121)**



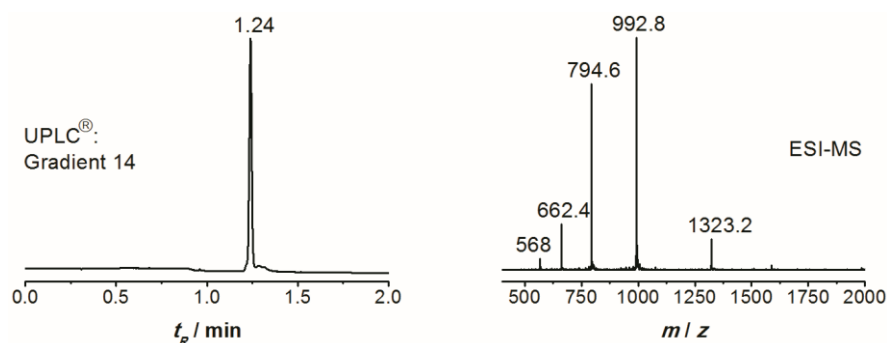
**Ac-gcactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)ttgccca-βAla-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-Gly-NH<sub>2</sub> (122)****H-*i*Cys-accgac((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ggc-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (126)****Ac-cccactccatc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (127)****H-*i*Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgt-Gly-NH<sub>2</sub> (128)**



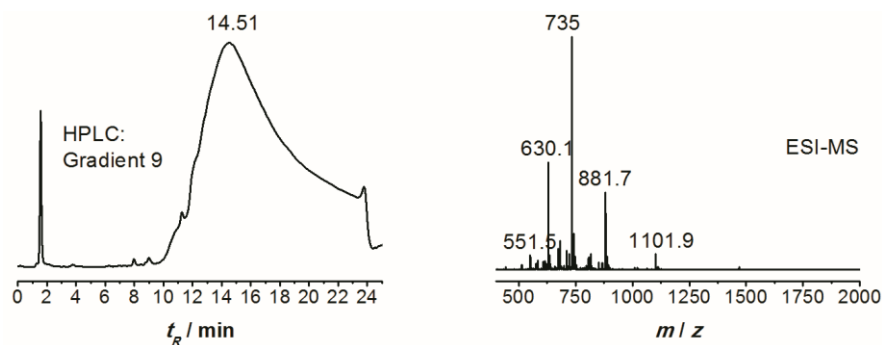
**Ac-(Lys)<sub>5</sub>-ccactccatc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)gag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (129)**



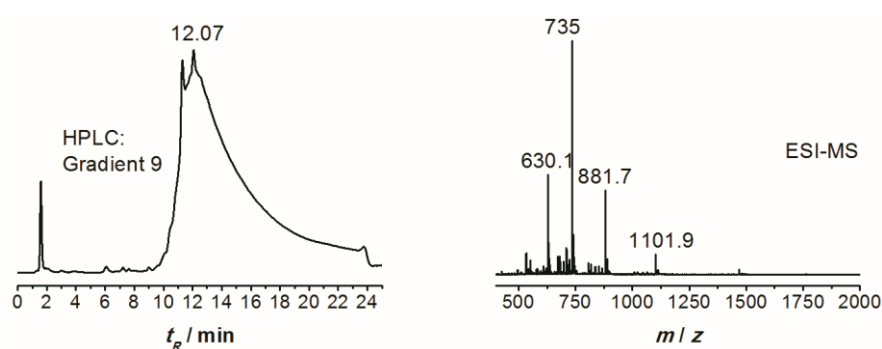
**H-*i*Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgta-(Lys)<sub>5</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (130)**



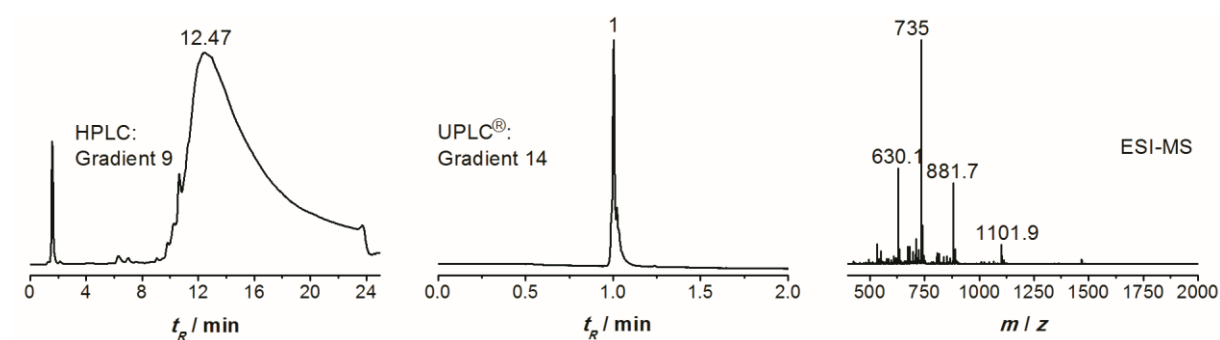
**Ac-cccactecat((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)cgag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (131)**



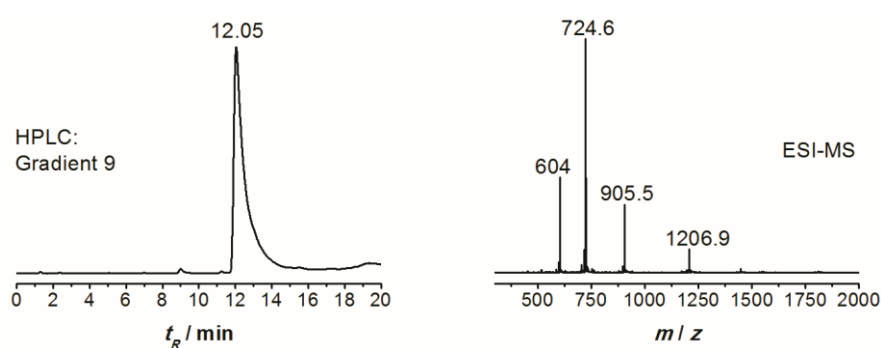
**Ac-cccactcc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)atcgag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (132)**



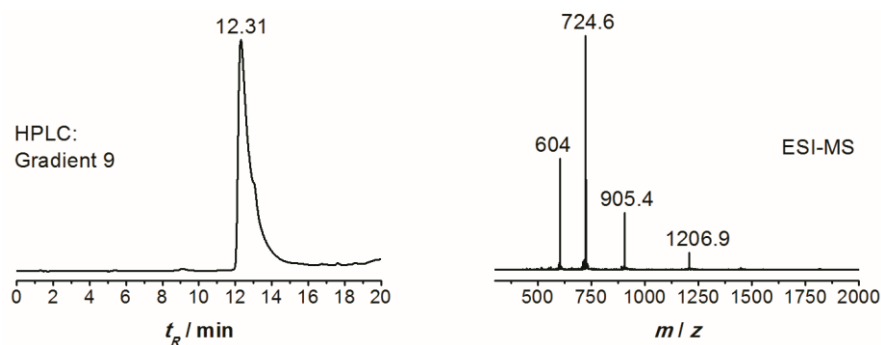
**Ac-cccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgag-βAla-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (133)**



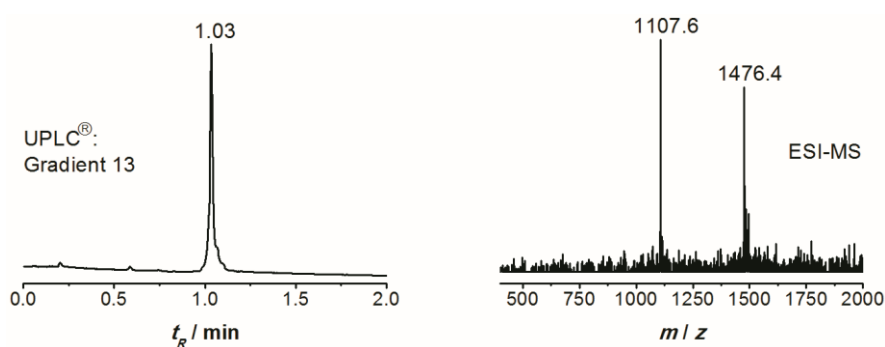
**H-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (134)**



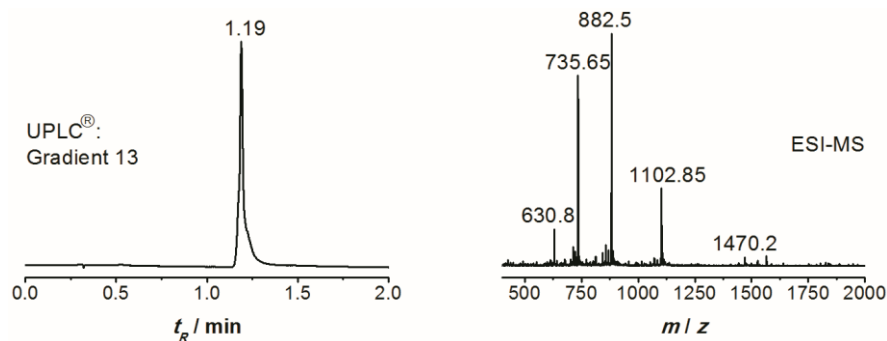
**H-*i*Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (135)**



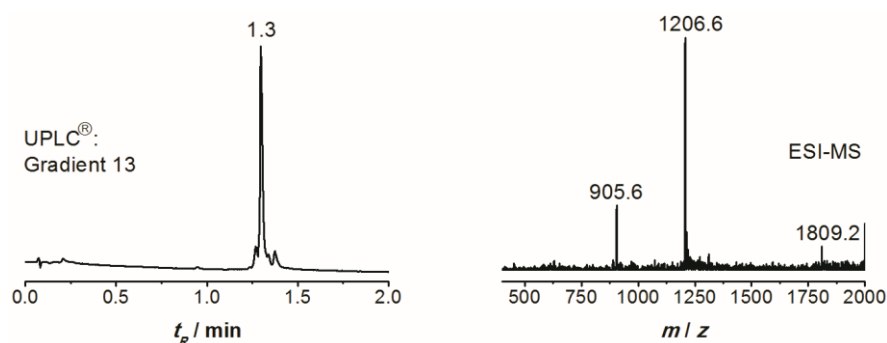
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-SR (136, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub>)**



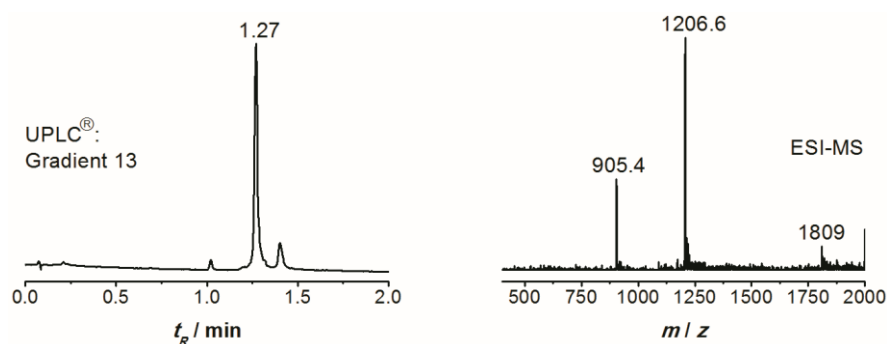
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-SR (136, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)**



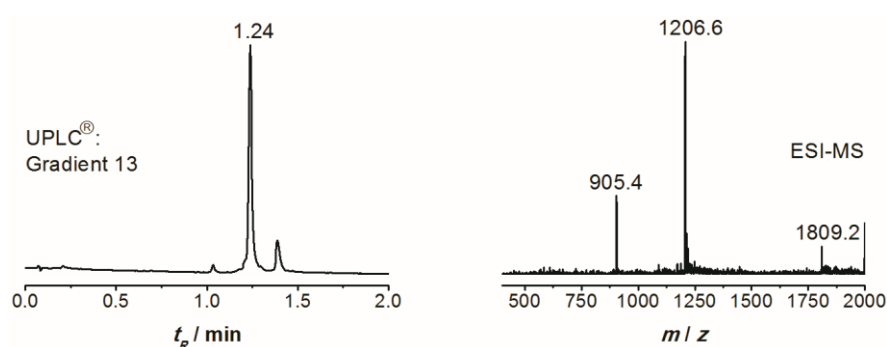
**H-Cys-t((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ttctctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (137)**

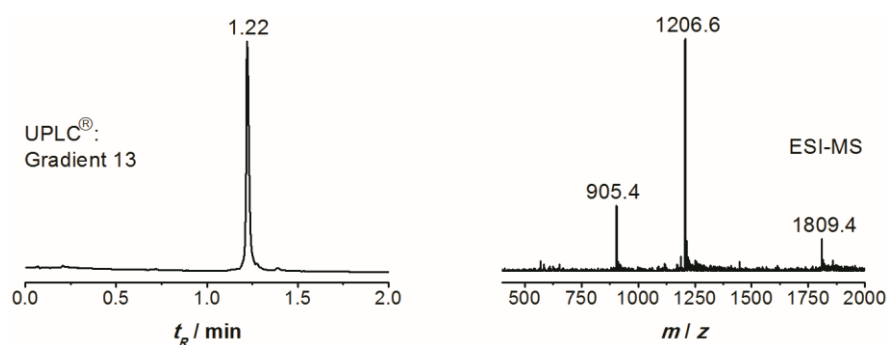
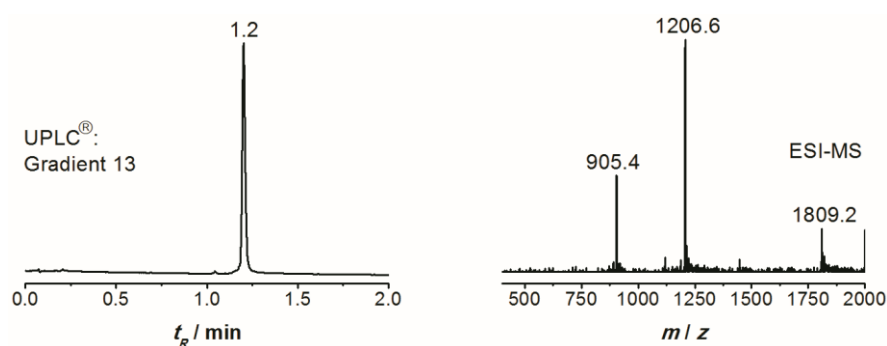
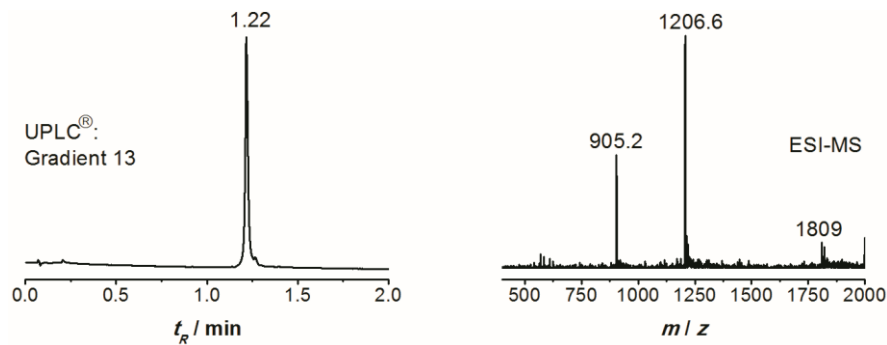
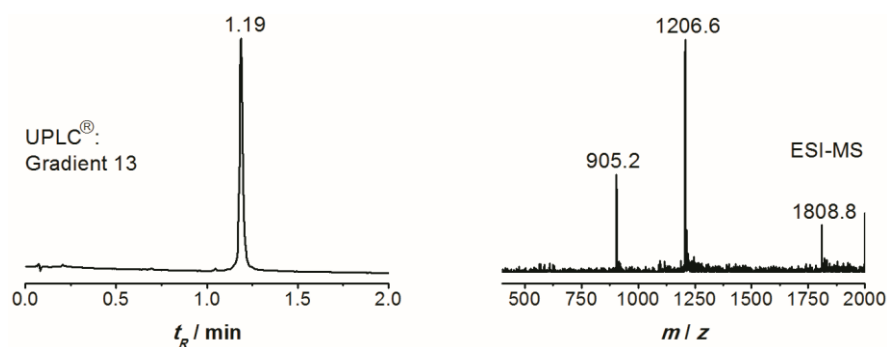


**H-Cys-tt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ttctctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (138)**

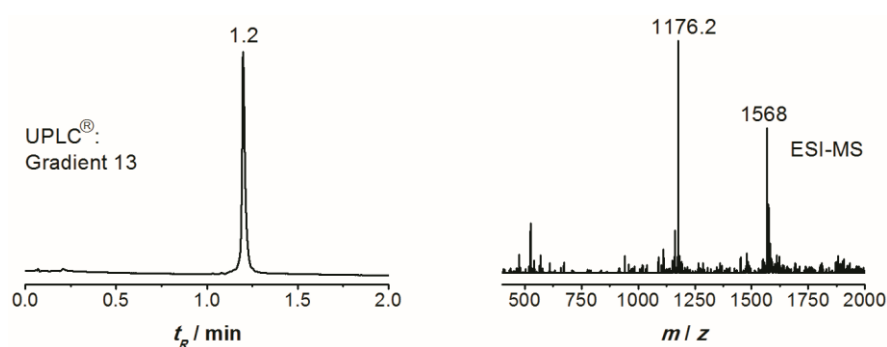


**H-Cys-ttt((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ctctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (139)**

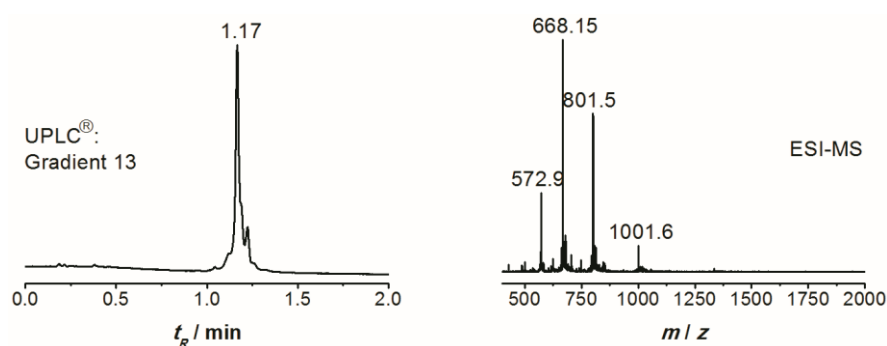


**H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (140)****H-Cys-tttct((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)ctgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (141)****H-Cys-tttctc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tgtag-Gly-NH<sub>2</sub> (142)****H-Cys-tttctct((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)gtag-Gly-NH<sub>2</sub> (143)**

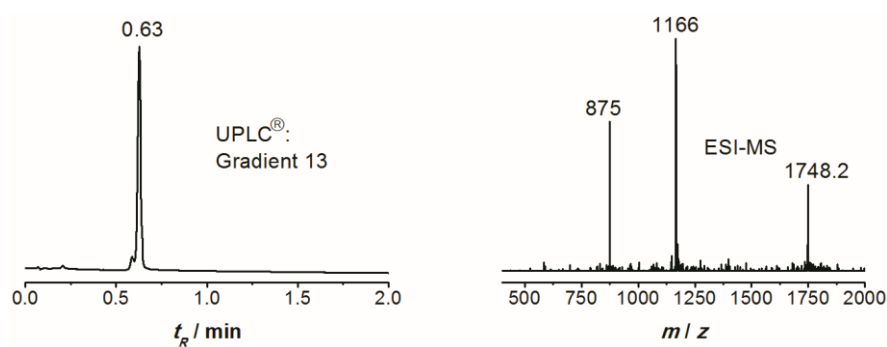
**H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtagctag-Gly-NH<sub>2</sub> (144)**



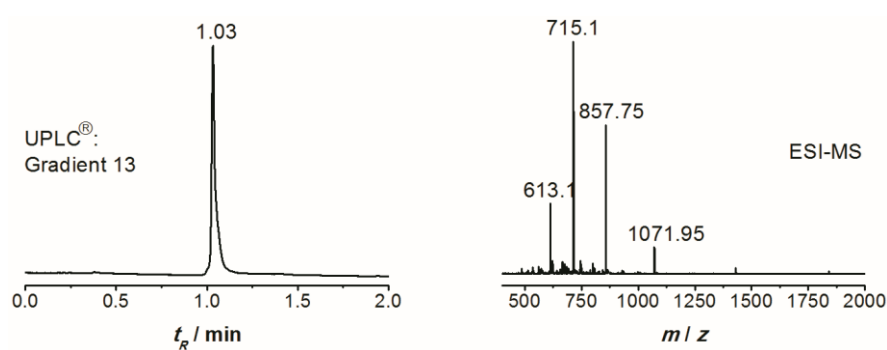
**H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (145)**



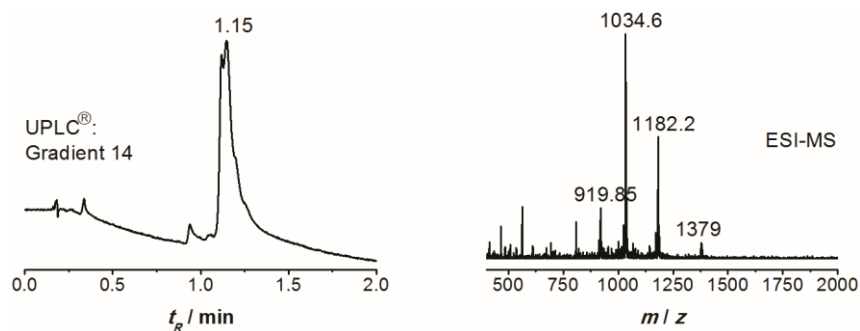
**H-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>)actgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (146)**



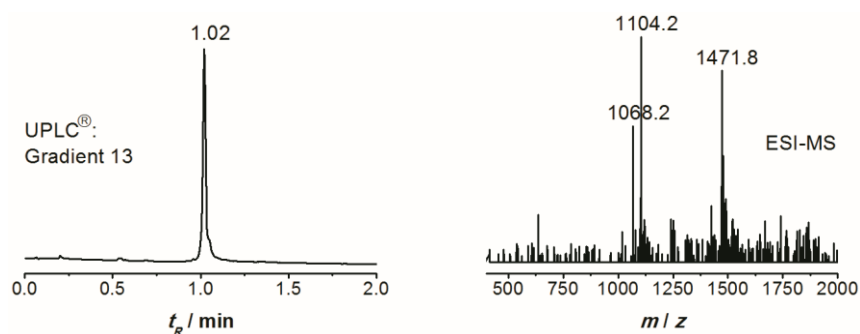
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-OH (147)**



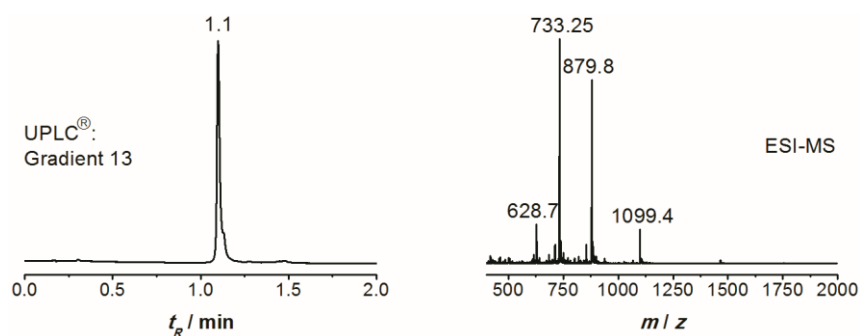
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (148)**



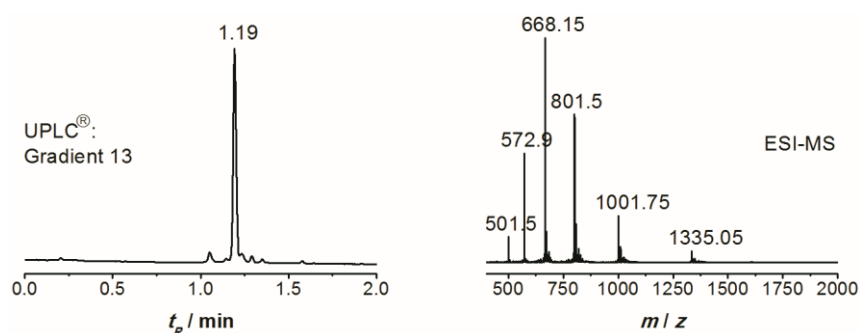
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-SR (149, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub>)**



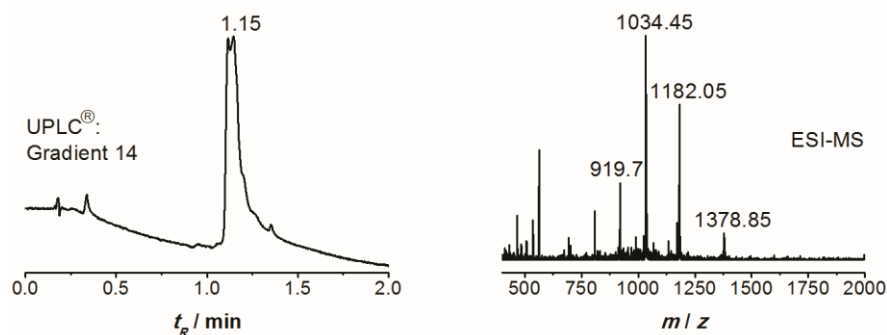
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-SR (149, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)**



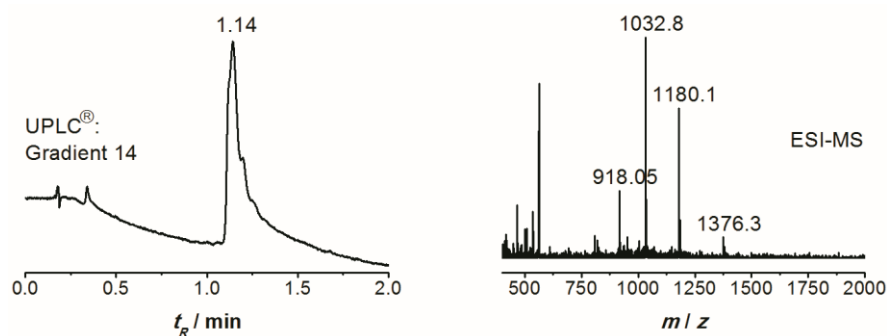
**H-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (150)**



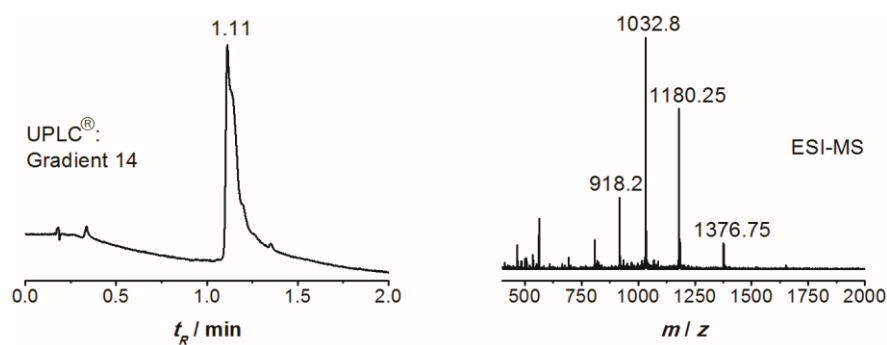
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-βAla-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (151)**

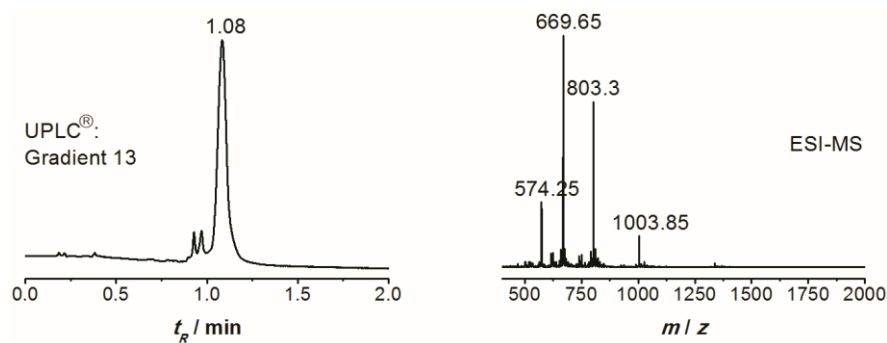
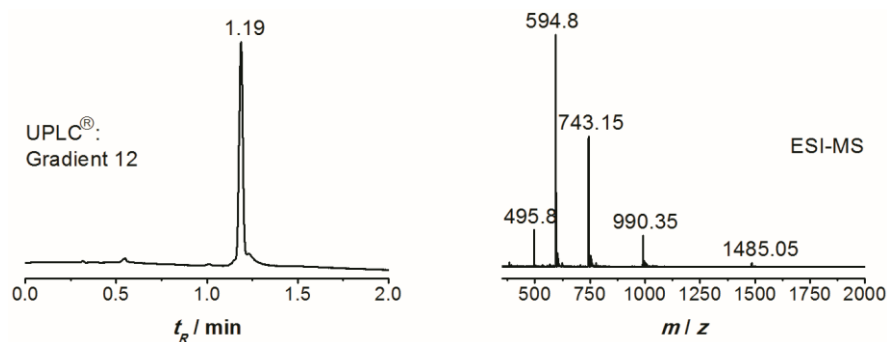
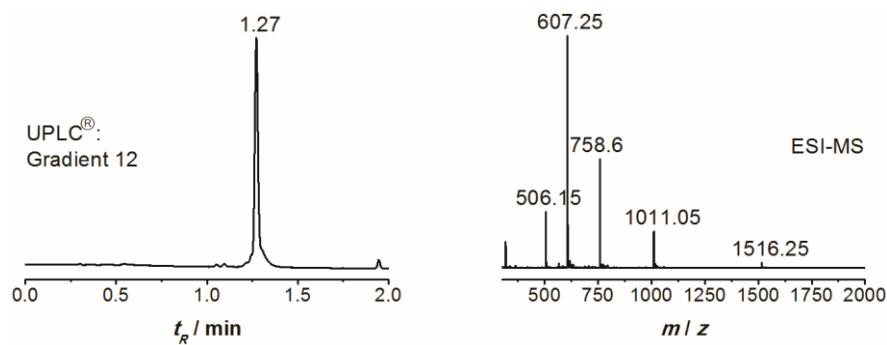
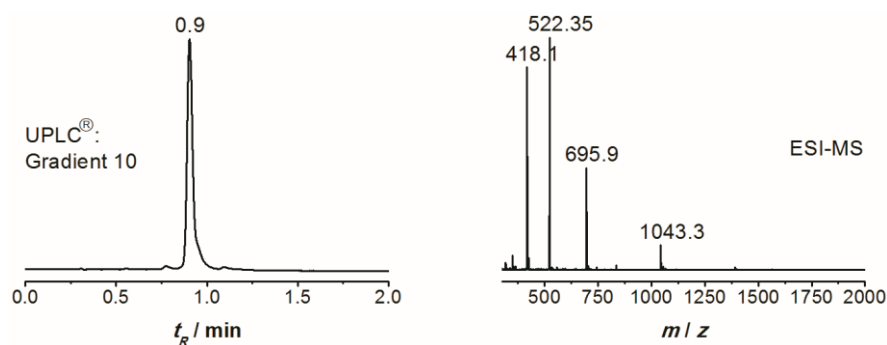


**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (152)**



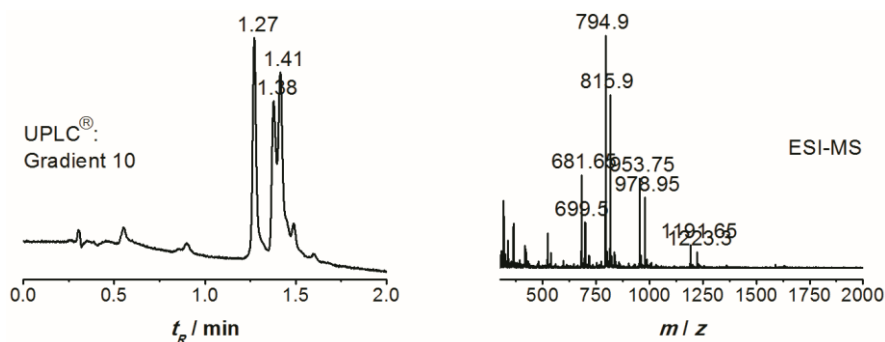
**Ac-ccactc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHFAM)catcgaga-Gly-*i*Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)tctgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (153)**



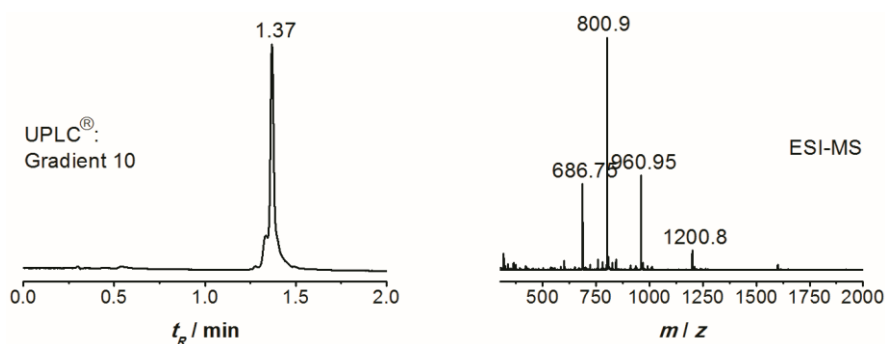
**H-Cys-tttc((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHTMR)actgtag-(Lys)<sub>3</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (155)****IAC-tettccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (156)****IAC-tettccccac-Gly-S(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)CH<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (157)****H-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (158)**



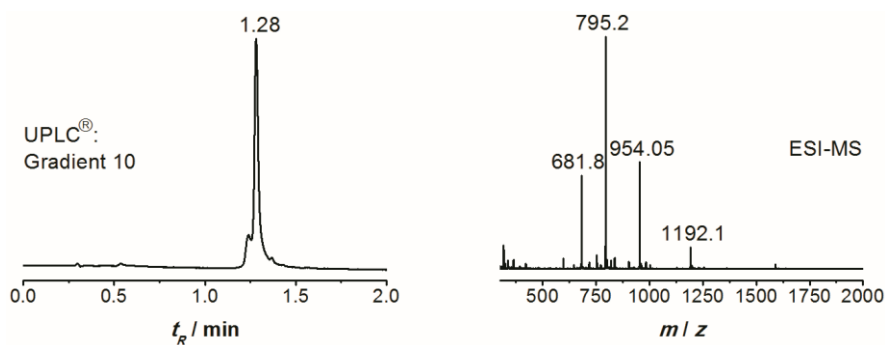
**IAc-tettccccac-Gly-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (159)**



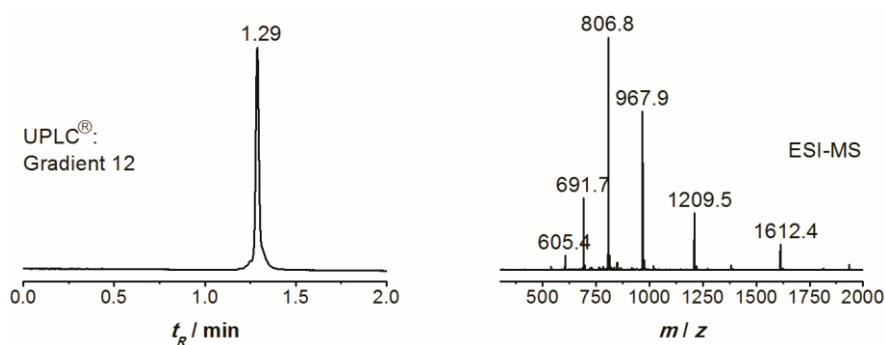
**ClAc-tettccccac-Gly-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (161)**

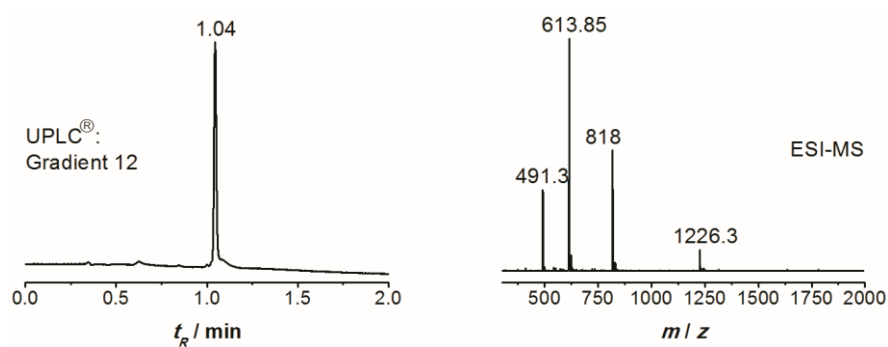
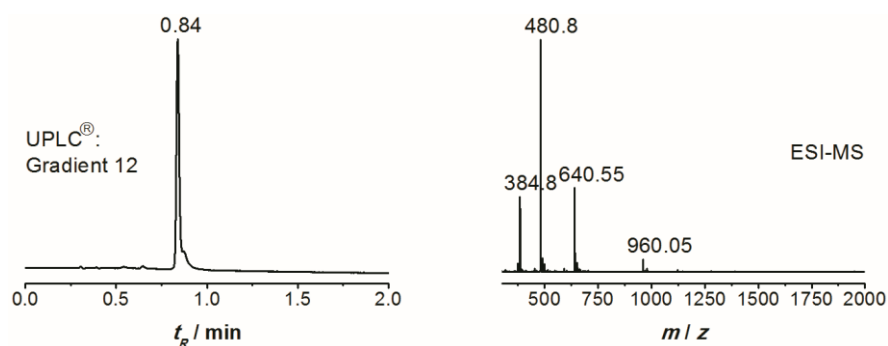
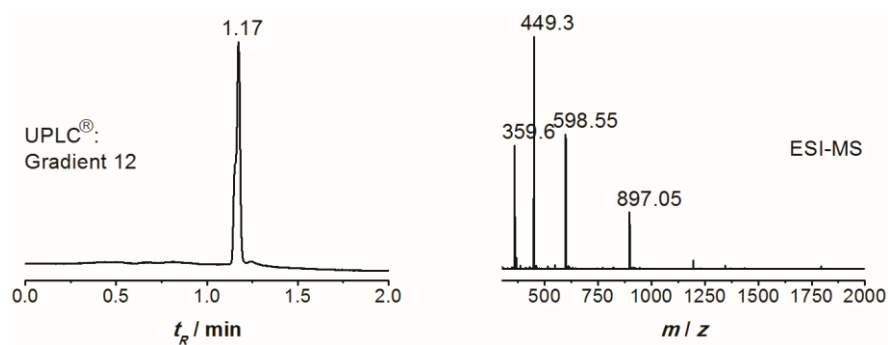
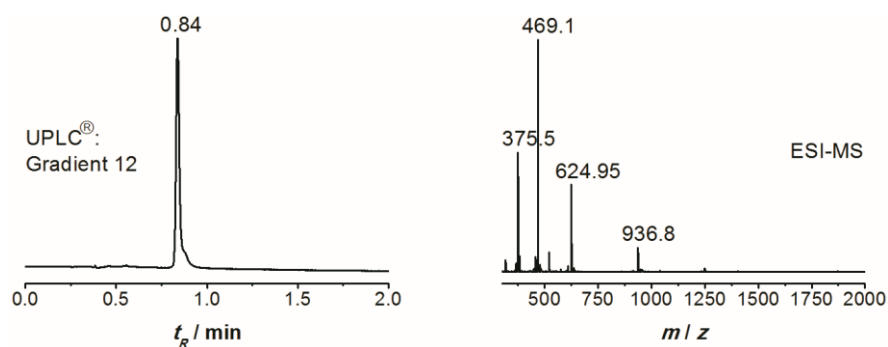


**Ac-tettccccac-Gly-*i*Cys-cctacag-Cys-NH<sub>2</sub> (162)**

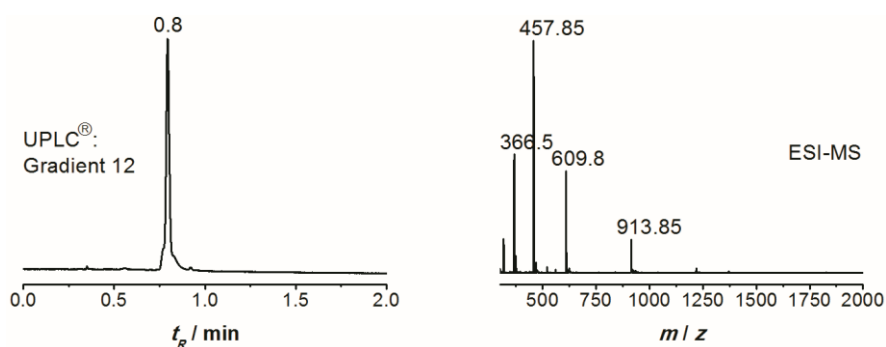


**Ac-tettccccacacctacag-Gly-NH<sub>2</sub> (163)**

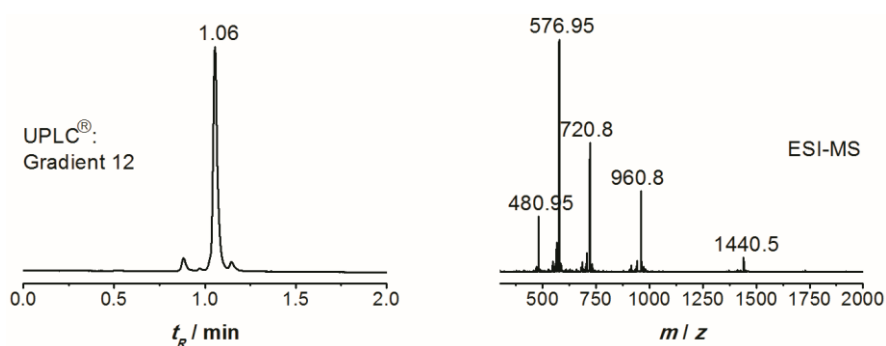


**IAc-ttccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (164)****IAc-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (165)****Ac-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (170)****BrAc-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (171)**

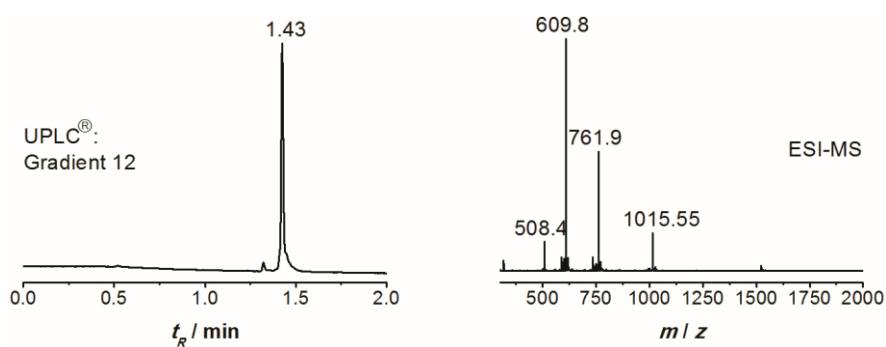
**ClAc-ccccac-Gly-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-NH<sub>2</sub> (172)**



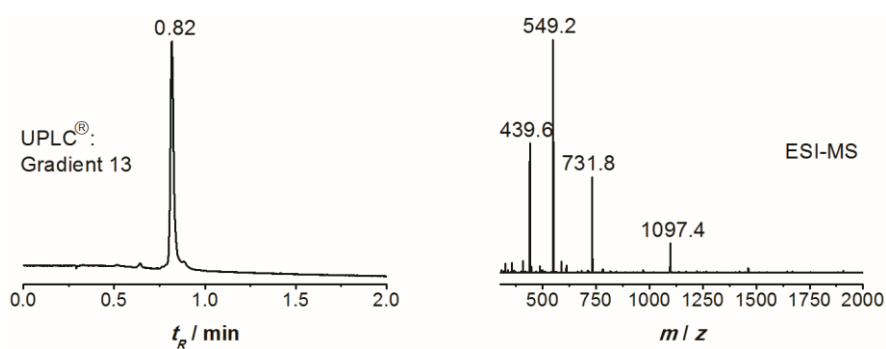
**BrAc-tcttccccac-Cys(H-Gly)-NH<sub>2</sub> (187)**

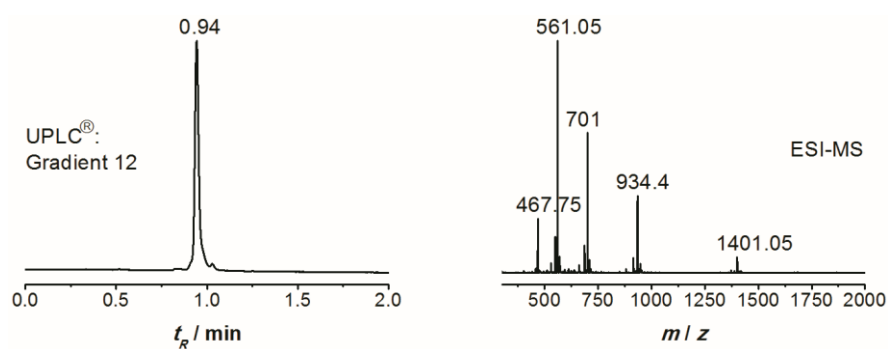
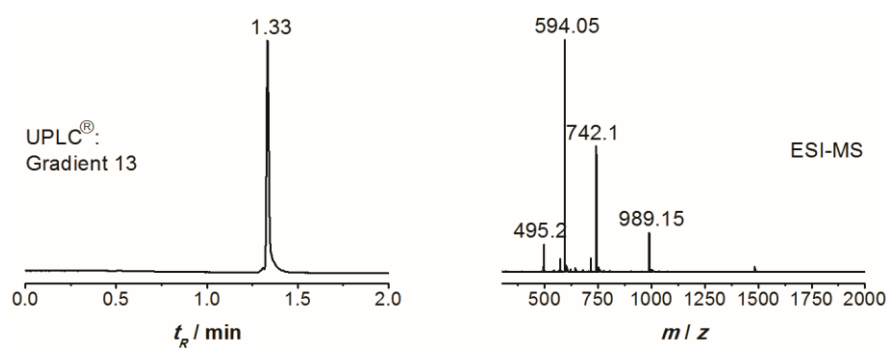
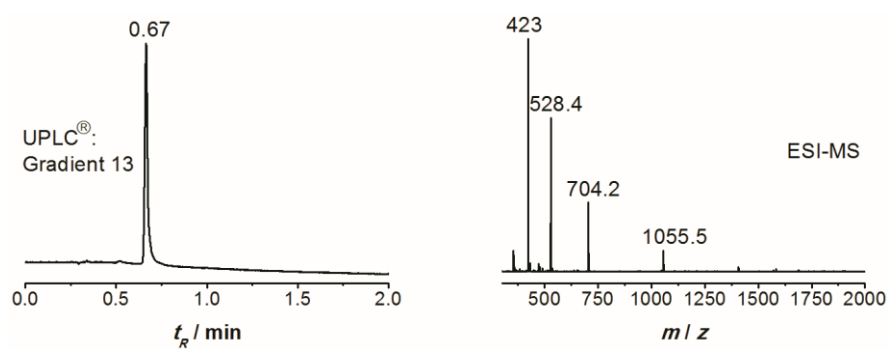
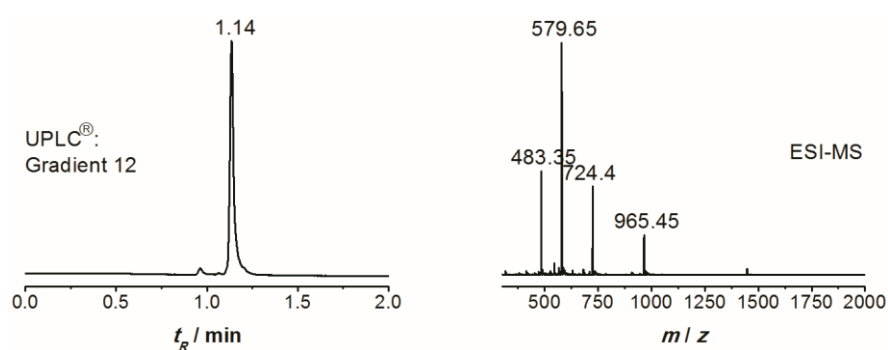


**BrAc-tcttccccac-Cys(ALO-Gly)-NH<sub>2</sub> (181)**

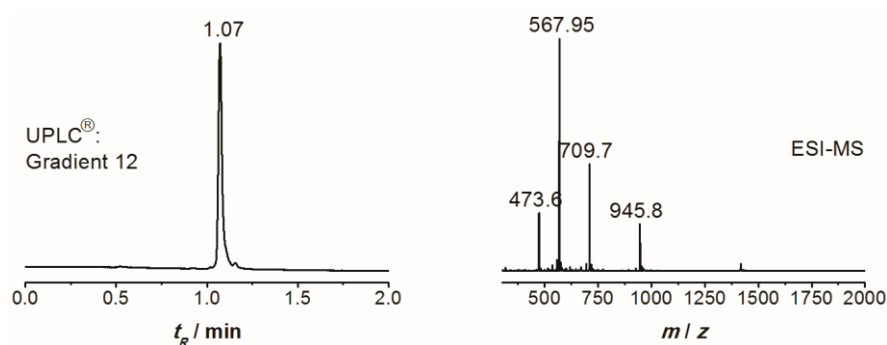


**H-Cys-cctacag-Lys(N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO)-NH<sub>2</sub> (182)**

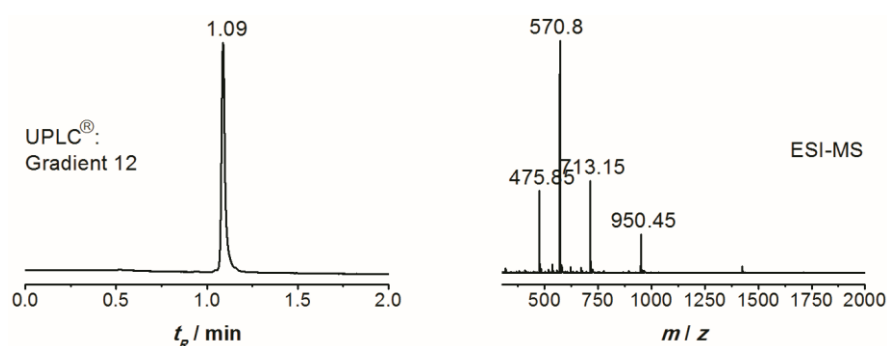


**Ac-tetttcccccac-Cys(H-Gly)-NH<sub>2</sub> (189)****Ac-tetttcccccac-Cys(ALO-Gly)-NH<sub>2</sub> (190)****H-Cys-ccttacag-Lys-NH<sub>2</sub> (191)****BrAc-tetttcccccac-Cys(H- $\beta$ Ala)-NH<sub>2</sub> (193)**

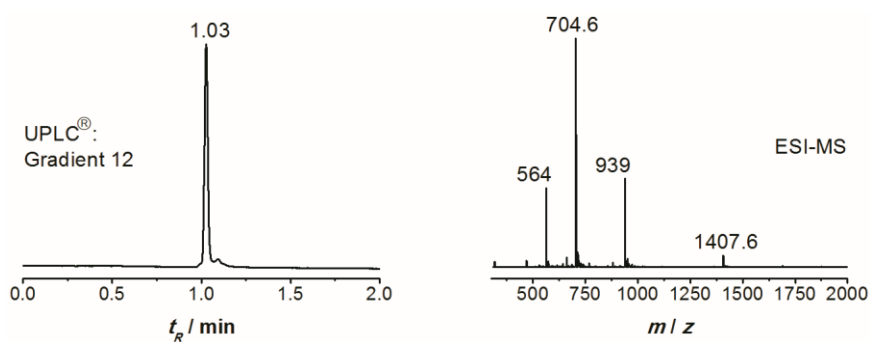
**ClAc-tcttccccac-Cys(H-Gly)-NH<sub>2</sub> (194)**



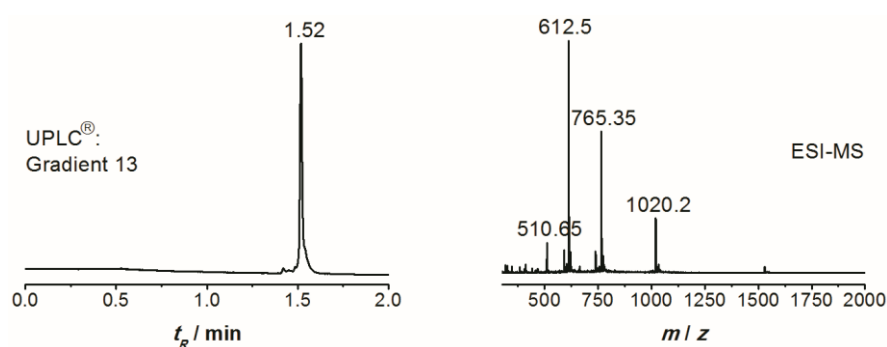
**ClAc-tcttccccac-Cys(H-βAla)-NH<sub>2</sub> (195)**

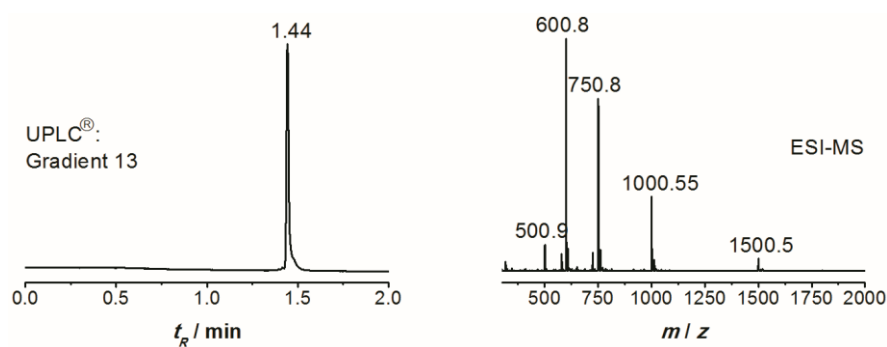
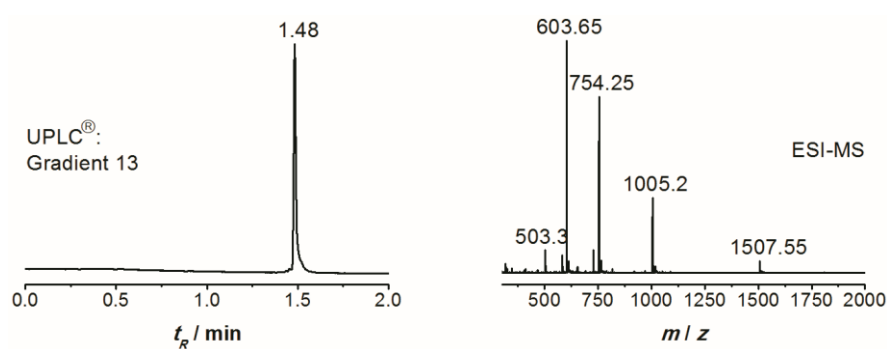
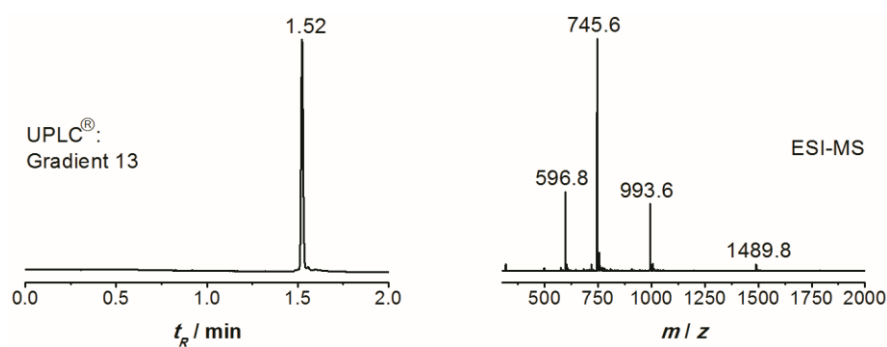
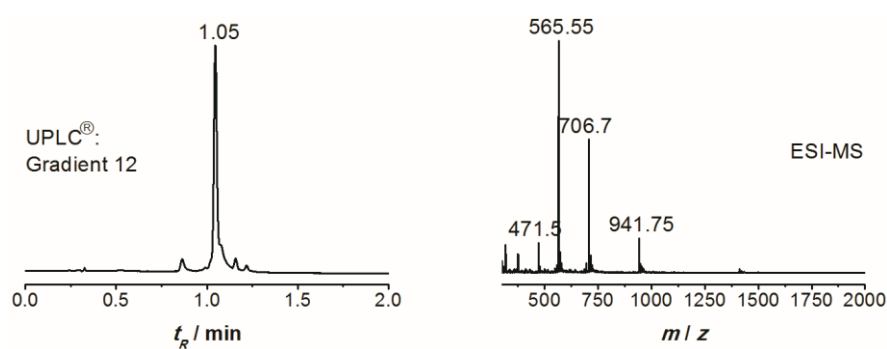


**Ac-tcttccccac-Cys(H-βAla)-NH<sub>2</sub> (196)**

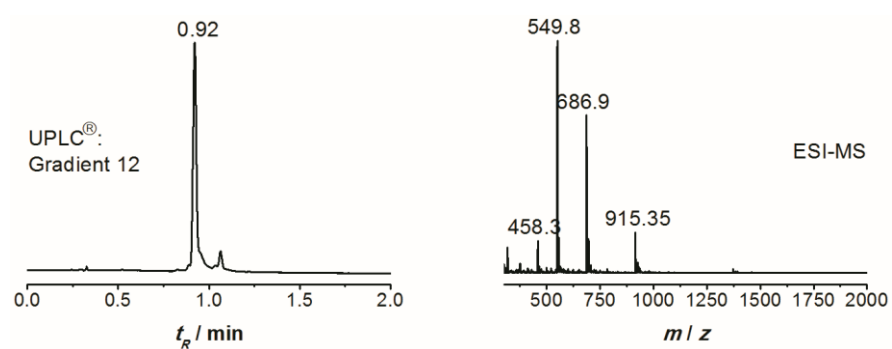


**BrAc-tcttccccac-Cys(ALO-βAla)-NH<sub>2</sub> (197)**



**ClAc-tcttccccac-Cys(ALO-Gly)-NH<sub>2</sub> (198)****ClAc-tcttccccac-Cys(ALO-βAla)-NH<sub>2</sub> (199)****Ac-tcttccccac-Cys(ALO-βAla)-NH<sub>2</sub> (200)****BrAc-tcttccccac-Cys-NH<sub>2</sub> (183)**

### Ac-tcttccccac-Cys-NH<sub>2</sub> (204)



## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Oliver Seitz, der mir ein sehr interessantes Promotionsthema überlassen hat. Mit seiner steten Diskussionsbereitschaft und vielen hilfreichen Anregungen unterstützte er mich fortwährend. Darüber hinaus ermöglichte er mir, meine Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anne Adams, Felix Hövelmann und Dr. Birgit Braun für die hilfreiche und schnelle Erstkorrektur dieser Arbeit.

Dem gesamten Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Nicht selten wurden auch nach der Laborarbeit Belange jenseits der Chemie mit dem nötigen Engagement diskutiert. Meine Laborkollegen Dr. Stefanie Thurley, Dr. Hendrik Eberhard, Dr. Franziska Diezmann, Melanie Fischbach, Ziv Harpaz und Dr. Gerbrand van der Heden van Noort sorgten immer für eine angenehme Zeit im Labor. Frank Abendroth danke ich für die wertvollen synthetischen Ratschläge und die vielseitigen fachlichen Diskussionen. Dr. Hendrik Eberhard unterstützte mich besonders am Anfang meiner Arbeit bei vielen analytischen Methoden und sorgte stets für einen guten Fluss in der HPLC. Diesen Part übernahmen später Anika Kern und Josephine Schmalisch, denen ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin.

Ich möchte mich außerdem bei Kathleen Hennig bedanken, die in ihrer Zeit als studentische Hilfskraft wertvolle Zuarbeit leistete und so manche PNA-Synthese meisterte. Dr. Gerbrand van der Heden van Noort, Dr. Anne Adams und Sonia León danke ich für die Synthese von weiteren wichtigen Ausgangsmaterialien. Dr. Gerbrand van der Heden van Noort danke ich zudem für die hilfreichen Diskussionen zum Transfer-Zyklisierungsprojekt. Meine Forschungspraktikanten Nora Freudenberger, Robert Gurke und Sebastian Lüneburg unterstützten mich ebenfalls tatkräftig bei meiner Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich Julia Michaelis, die mir den nötigen Rückhalt und die Unterstützung bot, um immer mit einem positiven Gefühl in die Zukunft zu blicken. Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich dafür, dass sie meinen Blick für die nicht wissenschaftlichen Belange stets offen hielten.



## Publikationsverzeichnis

### Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

„Evolution of Synthetic Polymers“ (Kommentar)

Alexander Roloff und Oliver Seitz, *Artif. DNA PNA XNA* **2010**, *1*, 1–3.

„Consecutive Signal Amplification for DNA Detection Based on De Novo Fluorophore Synthesis and Host–Guest Chemistry“

Xiao-Hua Chen, Alexander Roloff und Oliver Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4479–4483; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4556–4561.

„Bioorthogonal reactions challenged: DNA templated native chemical ligation during PCR“

Alexander Roloff und Oliver Seitz, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 432–436.

„The role of reactivity in DNA templated native chemical PNA ligation during PCR“

Alexander Roloff und Oliver Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3458–3464.

„Reducing Product Inhibition in Nucleic Acid-Templated Ligation Reactions: DNA-Templated Cycligation“

Alexander Roloff und Oliver Seitz, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2322–2328.

„Amplification by Nucleic Acid-Templated Reactions“ (Übersichtsartikel)

Julia Michaelis<sup>‡</sup>, Alexander Roloff<sup>‡</sup> und Oliver Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 2821– 2833 (<sup>‡</sup>geteilte Erstautorenschaft).

### Veröffentlichungen in Fachbüchern

„DNA-Templated Native Chemical Ligation of Functionalized Peptide Nucleic Acids: A Versatile Tool for Single Base-Specific Detection of Nucleic Acids“

Alexander Roloff, Simon Ficht, Christian Dose und Oliver Seitz, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *150*, 131–141.

## **Vorträge auf wissenschaftlichen Fachkonferenzen**

„Ultra Sensitive Single Base Specific Genotyping: DNA-templated Native Chemical Ligation during PCR“

Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks – Design and Applications (FB<sup>3</sup>),  
Göteborg, Schweden, **2012**.

„Bioorthogonal Reactions Challenged: DNA templated Native Chemical Ligation during PCR“

11th German Peptide Symposium, München, Deutschland, **2013**.

Berlin, im März 2014

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Alexander Roloff, die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.

---

Unterschrift